

**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# VÝVOJ A VALIDACE METODY STANOVENÍ REZIDUÍ NĚKTERÝCH HORMONÁLNĚ ÚČINNÝCH LÁTEK V BIOLOGICKÉM MATERIÁLU METODOU GC/MS

METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR THE ASSESMENT  
OF HORMONAL ACTIVE SUBSTANCES RESIDUES IN BIOLOGICAL MATERIAL BY GC/MS

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

MASTER'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

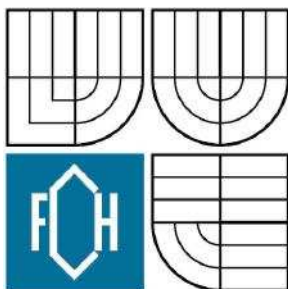
**Bc. HANA ZELNÍČKOVÁ**

**VEDOUcí PRÁCE**

SUPERVISOR

**MGR. LIBOR REJTHAR**

BRNO 2008



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	<b>FCH-DIP0189/2007</b>	Akademický rok: <b>2007/2008</b>
Ústav	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka)	<b>Zelníčková Hana Bc.</b>	
Studijní program	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí diplomové práce		
Konzultanti diplomové práce	Ing. Eva Vítová, Ph.D.	

### Název diplomové práce:

Vývoj a validace metody stanovení reziduí některých hormonálně účinných látek v biologickém materiálu metodou GC/MS

### Zadání diplomové práce:

1. Zpracujte literární přehled o:
  - hormonálně účinných látkách, jejichž použití je zakázáno při výkrmu hospodářských zvířat
  - jejich výskytu v živočišných materiálech
  - jejich vlivu na kvalitu produktů, používaných jako potravinářské suroviny
  - eventuální negativní účinky v lidském organismu
  - legislativní požadavky
  - metoda GC/MS, princip, teorie
2. Vypracujte a validujte metodu stanovení reziduí steroidních hormonálně účinných látek ve vybraných biologických matricích
3. Zhodnoťte výhody této metody a její použitelnost

### Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Hana Zelníčková  
student(ka)

Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.

Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato diplomová práce se věnuje problematice výskytu a stanovení hormonálně účinných látek v biologickém materiálu. Cílem teoretické části bylo zpracovat literární rešerši z dostupných knižních, elektronických i časopiseckých pramenů a firemních materiálů. Rešerše je zaměřená na souhrnný přehled hormonálně účinných látek, které se buď přirozeně vyskytují u různých druhů hospodářských zvířat, a nebo jsou synteticky připravené; popsat jejich vlastnosti a biologické účinky a také shrnout platné legislativní požadavky týkající se výskytu těchto látek v potravinách nebo potravinářských surovinách živočišného původu.

Cílem experimentální části bylo vyvinout a validovat analytickou metodu, vhodnou pro stanovení hormonálně účinných látek v biologickém materiálu. Vypracovaná metoda může sloužit jak ke screeningovému stanovení skupiny některých steroidních hormonálně účinných látek v moči hospodářských zvířat, tak k provádění konfirmačních analýz stejné skupiny látek ve stejné matrici na požadované koncentrační úrovni.

Použitá metoda je tedy určena ke kvantitativnímu stanovení steroidů v nízkých koncentracích v moči hospodářských zvířat. Mimo jiné splňuje kritéria konfirmačních metod určených pro sledování reziduí hormonálně účinných látek v biologickém materiálu dle Směrnice Rady 2002/657/EC.

Zjištěné parametry metody odpovídaly předpokládaným hodnotám. Metoda se ukázala jako zcela vyhovující, poskytovala žádané výsledky. Jednotlivé analyty byly s jistotou identifikovány, poskytovaly výrazné, symetrické a dobře oddělené píky.

Diplomová práce byla vypracována v Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv v Brně.

## ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the problematics of occurrence and quantitative determination of hormonal active substances in biological material. The objective of my thesis was to elaborate a literature search from available books, electronic and periodical sources and service materials. Literature search is aimed at an overall overview of hormonal active substances in biological material, which occur either naturally in different kind of animals, or are synthetically prepared; describe their characteristics and biological effects as well as summarize recent legislative requirements concerning occurrence of these substances in food or food raw material of animal origin.

The aim of experimental part was to develop and validate the analytical method, suitable for quantification of hormonal active substances in biological materials. Elaborated method is able to be used for screening determination of some steroid hormonal active substances in urine of farming animals, and for performance confirmative analysis of the same substances in the same matrix on required concentration level.

Used method is determined for quantification of steroids in low concentration level in urine of farming animals. Among others performs the criteria of confirmative methods intended for monitoring of residues of hormonal active substances in biological material according to Council Directive 2002/657/EC.

Determined parameters of the method answer the supposed values. The method proved to be quite suitable and offered required results. Individual analytes were identified, with certainty, they offer expressive, symmetrical and well separated peaks.

This diploma thesis was prepared in Institute for State Control of Veterinary Biologicals and Medicaments in Brno.

#### **KLÍČOVÁ SLOVA**

hormonálně účinné látky, GC, MS

#### **KEYWORDS**

hormonal active substances, GC, MS

ZELNÍČKOVÁ, H. *Vývoj a validace metody stanovení reziduí některých hormonálně účinných látek v biologickém materiálu metodou GC/MS*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 86 s. Vedoucí diplomové práce Mgr. Libor Rejthar.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího bakalářské práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

### *Poděkování:*

*Na tomto místě bych ráda poděkovala paní Martině Rejtharové, Mgr., a panu Liboru Rejtharovi, Mgr., za odborné vedení, užitečné rady, pomoc a podporu při zpracování této diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala i paní Ing. Vítové, Ph.D. za vstřícnost a konzultace.*

## OBSAH

1 ÚVOD .....	8
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Steroidní hormony .....	11
2.1.1 Obecná charakteristika steroidních hormonů .....	11
2.1.2 Biosyntéza steroidů .....	12
2.1.3 Metabolismus steroidních hormonů .....	12
2.1.4 Účinky steroidních hormonů .....	13
2.1.5 Výskyt v živočišném materiálu .....	13
2.2 Přirozené steroidní hormony .....	15
2.2.1 Androgeny .....	15
2.2.2 Estrogeny .....	16
2.3 Syntetické steroidní sloučeniny .....	18
2.3.1 Obecná charakteristika syntetických steroidů .....	18
2.3.2 Historie syntetických steroidů .....	18
2.3.3 Příjem syntetických steroidů .....	19
2.3.4 Syntetické steroidy a poškození zdraví .....	19
2.3.5 Využití syntetických steroidů v léčbě .....	21
2.3.6 Zástupci syntetických steroidů .....	21
2.4 Další zajímavé látky skupiny A .....	27
2.5 Veterinární léčiva .....	30
2.6 Legislativní požadavky .....	30
2.6.1 Platná legislativa .....	30
2.6.2 Maximální limity reziduí .....	32
2.6.3 Minimální požadované limity analytické metody .....	32
2.7 Validace metody .....	33
2.7.1 Charakteristika validačních parametrů .....	33
2.7.2 Validační parametry dle platné legislativy EU .....	34
2.8 Zvolená analytická metoda .....	35
2.8.1 Metoda vnitřního standardu .....	35
2.8.2 Derivatizace .....	36
2.8.3 Primární extrakce .....	36
2.8.4 Extrakce tuhou fází .....	36
2.8.5 Plynová chromatografie .....	37
2.8.6 Hmotnostní spektrometrie .....	41
2.8.7 Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie .....	45
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	46
3.1 Laboratorní vybavení .....	46
3.1.1 Standardy a vnitřní standardy .....	46
3.1.2 Chemikálie .....	46
3.1.3 Plyny .....	46
3.1.4 Přístroje .....	47

3.1.5 Pracovní pomůcky .....	47
3.2 Roztoky standardů .....	47
3.3 Použitá analytická metoda .....	48
3.3.1 Kalibrace .....	48
3.3.2 Deaktivace aluminu .....	48
3.3.3 Dekonjugace $\beta$ -glukuronidasou .....	49
3.3.4 Příprava primárního extraktu na koloně .....	49
3.3.5 Čištění extraktu na koloně .....	49
3.3.6 Derivatizace pomocí aceton / HFBA .....	49
3.4 Analýza steroidů .....	49
3.5 Statistické zpracování dat .....	50
4 VÝSLEDKY A DISKUZE .....	52
4.1 Výběr vhodného derivatizačního činidla .....	52
4.2 Výběr vhodné kolonky .....	52
4.3 Identifikace jednotlivých steroidů .....	52
4.4 Validace metody .....	57
4.4.1 Linearita metody .....	57
4.4.2 Opakovatelnost .....	62
4.4.3 Robustnost metody .....	62
4.4.4 Správnost .....	62
4.4.5 Selektivita .....	62
4.4.6 Stabilita .....	62
4.4.7 Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost a výpočet limitu rozhodnutí $CC\alpha$ a detekční schopnosti $CC\beta$ .....	63
4.5 Konfirmace .....	63
4.6 Srovnání metody s metodou používanou institutem RIVM .....	66
4.7 Vyšetření neznámých vzorků .....	66
5 ZÁVĚR .....	75
6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	76
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....	79
8 PŘÍLOHY .....	80

# 1 ÚVOD

Pojem hormonálně účinné látky zahrnuje jednak přirozené hormony, jednak syntetické látky s podobným fyziologickým účinkem. Užití hormonálně účinných látek při výkrmu hospodářských zvířat je v zemích EU zakázáno nařízením Komise CD 96/22/EC. Rezidua těchto látek přítomná v tkáních zvířat používaných pro produkci potravin by mohla znamenat možné riziko pro lidské zdraví. Evropská Unie tak garantuje konzumentům, že potraviny na trhu jsou bezpečné.

Z rozhodnutí Rady EU CD 96/23/EC vyplynula členským státům povinnost monitorovat případný výskyt reziduí látek zakázaných při výkrmu hospodářských zvířat a dalších skupin látek (veterinární léčiva, pesticidy, těžké kovy aj.) v procesu výroby potravin živočišného původu.

Každý členský stát EU má k tomuto účelu zřízenou jednu nebo více laboratoří (NRL), které za tuto činnost zodpovídají. Kromě toho jsou v EU zřízeny unijní referenční laboratoře (CRL) pro všechny skupiny v rámci monitoringu sledovaných látek.

Požadavky na analytické metody používané v rámci monitoringu jsou dány Rozhodnutím Komise 2002/657/EC, kde jsou stanoveny i závazné způsoby interpretace výsledků. Přípustné metody jsou rozděleny na screeningové a konfirmační. Konfirmační metody, kterých se týká tato práce, musí být separační (GC nebo LC) s hmotnostně spektrometrickou (MS) detekcí. Požadavky na citlivost použitých metod jsou stanoveny pro zakázané látky Rozhodnutím Komise 2003/181/EC jako MRPL, pro ostatní se vztahují k hodnotám MRL [32].

## **Látky sledované v rámci monitoringu prováděného podle CD 96/23/EC**

### **Skupina A – Látky s anabolickým účinkem a zakázané látky**

#### **1. Stilbeny, jejich deriváty, soli a estery**

- Diethylstilbestrol
- Dienestrol
- Hexestrol

#### **2. Thyreostatické látky**

- Thiouracil
- Methylthiouracil
- Propylthiouracil
- Tapazol



### **3. Steroidy**

- 17 $\beta$ -boldenon
- 17 $\beta$ -nortestosteron (17 $\alpha$ -nortestosteron)
- Ethinylestradiol
- 17 $\beta$ -estradiol
- Methyltestosteron
- 17 $\beta$ -trenbolon (17 $\alpha$ - trenbolon)
- Stanozolol (16 $\beta$ -hydroxystanozolol)
- Megestrol (acetat)
- Melengestrol (acetat)
- Chlormadinon
- Medroxyprogesteron
- Dexamethason

### **4. Laktony kyseliny resorcylové včetně zeranolu**

- Zeranol
- Taleranol
- Zearalanol

### **5. Beta-agonisté (látky stimulující beta-adrenergní receptory)**

- Clenbuterol
- Brombuterol
- Chlorbrombuterol
- Mabuterol
- Mapenterol
- Tulobuterol
- Hydroxymethylclenbuterol
- Clenpenterol
- Clenpropenterol
- Cimaterol
- Isoxsuprine
- Ritodrin
- Ractopamin
- Clencyclohexerol
- Salbutamol
- Salmeterol
- Zilpaterol
- Fenoterol
- Terbutalin
- Orciprenalín

**6. Látky uvedené v příloze IV Nařízení Rady No 2377/90 (EHS) z 26. června 1990**

- Nitroimidazoly (Ronidazol, Metronidazol, Dimetridazol a jejich metabolity)
- Chloramfenikol
- Nitrofurany
- Dapsone
- Chlorpromazin

**Skupina B – veterinární léčiva a kontaminanty**

**1. Antibakteriální látky včetně sulfonamidů a chinolonů**

**2. Ostatní veterinární léčiva**

- Anthelmintika
- Antikokcidika
- Karbamáty a dithiokarbamáty
- Sedativa
- Nesteroidní protizánětlivé látky
- Ostatní farmakologicky účinné látky

**3. Ostatní látky a kontaminanty prostředí**

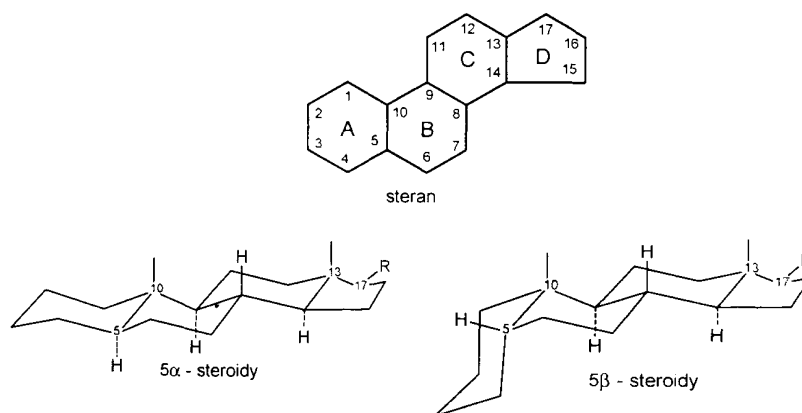
- Organochlorové sloučeniny včetně PCB
- Organofosforové sloučeniny
- Chemické prvky
- Mykotoxiny
- Barviva
- Ostatní

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Steroidní hormony

#### 2.1.1 Obecná charakteristika steroidních hormonů

Jako steroidy se označují sloučeniny s perhydrocyklopentanofenantrenovým jádrem, složeným ze čtyř kruhů. Jsou to alicyklické alkoholy, mají lipofilní charakter. Jedná se o krystalické bezbarevné látky s vysokým bodem varu. Jejich molekula je přibližně rovinná. Různorodost derivátů, které lze odvodit od steranu, je rozšířena existencí 6 center chiralit. V přírodě se objevuje jediné možné spojení kruhů B a C a většinou i kruhů C a D. Kruhy A a B mohou být spojeny odlišně na uhlíku 5, a to buď *trans* u  $5\alpha$ -steroidů, nebo *cis* u  $5\beta$ -steroidů [3,4].



Hormony jsou endogenní, tělu vlastní látky produkované specializovanými buňkami a jimi vylučované do organismu. Jsou to látky se silným fyziologickým účinkem, působí regulačně podnětně nebo tlumivě na činnost tělních orgánů. Hormony jsou ale pojmem především fyziologickým. Charakteristické znaky, které tyto látky, chemicky často velmi odlišné, spojují do jedné skupiny, jsou dány místem jejich vzniku a jejich působením, nikoliv tedy jejich chemickým složením. Jedná se o fyziologicky a farmakologicky významné látky [1, 13].

Mezi steroidy patří hormony pohlavní (sexuální), které se dělí na ženské (estrogeny, gestageny) a mužské (androgeny) [1].

Steroidní hormony mohou být přirozené nebo syntetické. K přirozeným steroidním hormonům patří testosteron s anabolickými (tj. podporujícími nárůst svalové hmoty) účinky, a estradiol s progesteronem, které způsobují nárůst tuku v těle. [2]. Mezi syntetické hormonální preparáty patří např. boldenon, methyltestosteron, norclostebol a další. Syntetické steroidní hormony mají podobné hormonální účinky jako přirozené hormony, jsou připravovány synteticky a mohou být případně podávány hospodářským zvířatům za účelem zvýšení produktivity jejich chovu [49].

Éra výzkumu steroidních hormonů začíná v 30. letech minulého století. První z nich – estron – byl izolován v roce 1929, v době, kdy nebyla ještě známá struktura skeletu. V roce

1930 byl připraven z nadledvinové kůry účinný extrakt kortin a z něj o několik let později izolovány čisté korové hormony – kortikosteroidy [2].

Steroidy se dají rozdělit podle biologického účinku do 5 skupin [2]:

- glukokortikoidy – C-21 steroidy
- mineralokortikoidy – C-21 steroidy
- androgeny – C-19 steroidy
- estrogeny – C-18 steroidy
- gestageny – C-21 steroidy

### 2.1.2 Biosyntéza steroidů

Základním pochodem tvorby steroidů je přeměna cholesterolu na pregnenolon v nadledvinách na rozhraní mezi *zona fasciculata* (střední vrstva) a *reticularis* (vnitřní vrstva).

Biosyntéza androgenů, estrogenů i gestagenů je centrálně řízena hypofyzárním LH (luteinizační hormon), jehož sekrece je stimulována hypothalamickým LHRH (luteinizační releasing hormon). LH působí na vmezeřené Leydigovy buňky varlat a na žluté tělísko vaječníku, kdy prekursory k tvorbě androgenů jsou tytéž jako u steroidů kůry nadledvin [2].

Pregnenolon je prekurzorem všech steroidních hormonů. K jeho přeměně na steroidní hormony dochází v endoplazmatickém retikulu, mitochondriích a cytoplazmě. Steroidy nejsou ukládány v endokrinních žlázách. Jakmile jsou totiž vytvořeny, jsou vyloučeny do oběhu. Steroidní hormony jsou lipofilní, snadno procházejí membránou a vstupují do cytoplazmy. Váží se na intracelulární receptory, které jsou buď v cytoplazmě, nebo v jádře cílových buněk. Komplex hormon-receptor působí jako transkripční faktor ⇒ aktivuje nebo potlačuje expresi genů. V případě aktivace genů, dochází k syntéze proteinů, které vyvolávají příslušnou biologickou odpověď. Vzhledem k tomu, že steroidy zasahují do exprese genů, nastupují jejich účinky ve srovnání s ostatními hormony pomaleji, ale zato jsou déletrvající [47, 48].

Z dalších cest je známá přímá konverze progesteronu na testosteronacetát a dehydroepiandrosteronu na testosteron. Při nádorech varlat, vycházejících z jejich vmezeřených buněk, byla zjištěna další cesta biosyntézy androgenů z kortisolu a z 21-deoxykortisolu na adrenosteron [2].

### 2.1.3 Metabolismus steroidních hormonů

Inaktivace steroidních hormonů je často spojena s oxidací, hydroxylací nebo redukcí jejich molekul, s eliminací dvojné vazby v kruhu A, nebo s odštěpením bočního řetězce. Často se tyto pochody kombinují a steroidní hormon je převáděn v celou řadu méně aktivních až neaktivních steroidů a konjugátů. Konjugace probíhá na C3 s glukosiduronátem nebo se sulfátem, čímž se zvýší jejich rozpustnost ve vodě a snáze se vyloučí. Ke konjugaci dochází zejména v játrech, dále pak v ledvinách. 70% konjugovaných steroidů se vyloučí močí, 20 % ve stolici a zbytek kůží [17].

Faktory řídící míru anabolismu a katabolismu steroidních hormonů v organismu jsou málo známé.

Celková rychlost absorpce dávky hormonu může být ovlivňována řadou faktorů, např. technikou dávkování, velikostí dávky, přítomností sekundárních anabolik v dávce.

Přítomnost a koncentrace reziduí hormonálně účinných látek v živočišných tkáních závisí na stupni jejich metabolismu a vylučování. Rezidua se běžně nacházejí ve svalech, tuku, ledvinách, játrech a mléku stejně tak v moči, žluči a výkalech. Obecně lze říci, že koncentrace reziduí má tendenci být vyšší ve výkalech než ve tkáních [1, 2].

#### 2.1.4 Účinky steroidních hormonů

Vlastní účinky hormonů v organismu nelze vykládat jednotným způsobem. Rizikem z reziduí jsou hlavně potenciální karcinogenní účinky u člověka (zvláště v reprodukčních orgánech a v mléčné žláze). Vesměs převládá názor, že vzhledem k nepatrnému reziduálnímu množství použitých hormonů v těle zvířat, pohybujícím se v rozmezí normálních, fyziologických hodnot látek s odpovídajícím biologickým účinkem (endogenních hormonů), není riziko, ve smyslu ohrožení zdraví konzumentů, významné. Zákaz v evropských zemích vychází hlavně z odmítavého postoje široké veřejnosti k tomuto typu zvyšování produkce. V této souvislosti se hovoří i o jiných faktorech než čistě toxikologických, z etického pohledu nepřijatelných, např. zátěž pro zvíře při nadměrné stimulaci růstu nebo produkci mléka či vajec [5, 9].

#### 2.1.5 Výskyt v živočišném materiálu

V členských státech EU se kvůli kontrole možného výskytu reziduí monitoruje ročně zhruba 900 000 vzorků všech sledovaných látek dle CD 96/23/EC. Cílem monitoringu je zvýšit bezpečnost potravin.

Například v roce 2006 bylo členskými státy EU nalezeno 101 výsledků překračujících povolené přípustné limity [29].

**Tabulka č. 1:** Počet zkoumaných vzorků steroidů v letech 2005 a 2006

Steroidy	Cílové vzorky		Podezřelé vzorky	
	2005	2006	2005	2006
<b>Hovězí dobytek</b>	28 018	28 009	2 408	2 350
<b>Prasata</b>	11 229	11 751	440	83
<b>Ovce a kozy</b>	1 161	1 156	21	10
<b>Koně</b>	157	193	6	3
<b>Drůbež</b>	3 613	3 912	21	3
<b>Vodní zvěř</b>	364	378	31	0
<b>Králíci</b>	93	94	4	0
<b>Vysoká zvěř</b>	60	62	3	0

**Tabulka č. 2:** Přehled vyhodnocených vzorků steroidů v letech 2005 a 2006

Druh zvířete	Látka	Členský stát	Počet vzorků s překročenými limity	
Hovězí dobytek				
Cílový vzorek	19-Norepistestosteron	Estonsko	1	
	Betamethason	Itálie	1	
	Boldenon	Německo	1	
	α-Boldenon	Rakousko (2), Německo(2), Holandsko (1)	5	
	Dexamethason	Itálie (9), Holandsko (2)	61	
	Epinandrolon	Itálie	1	
	17α-Estradiol	Litva	1	
	17β-Estradiol	Německo (1), Francie (1), Polsko (1)	3	
	Nandrolon	Francie (2), Velká Británie (2)	4	
	Prednisoon	Itálie	2	
	Progesteron	Velká Britáie	20	
	17α-testosteron	Slovinsko	1	
	Celkem cílových vzorků			101
	Podezřelý vzorek	Dexamethason	Itáie	54
Estradiolbenzoát		Belgie	1	
Prednisolon		Itálie	5	
Progesteron		Belgie	1	
Testosteroncypionát		Belgie	1	
Celkový počet podezřelých vzorků			62	
Prasata				
Cílový vzorek	17β-Estradiol	Francie	1	
	Nandrolon	Česká republika (2), Německo (9), Francie (2), Polsko (11)	24	
	Progesteron	Slovinsko		
	Celkový počet cílových vzorků			26
Drůbež				
Cílový vzorek	Ethinylestradiol	Itálie	1	
	Celkový počet cílových vzorků			1
Ovce/Kozy				
Cílový vzorek	Nandrolon	Velká Británie	16	
	Celkový počet cílových vzorků			16

Odběry se provádí náhodně, bez předchozího podezření na podávání hormonálně účinných látek zvířatům. Nejdříve se provede screening, pokud jsou jeho výsledky podezřelé, provede se konfirmace, aby se přítomnost růstových stimulátorů skutečně potvrdila nebo vyloučila.

Vzorky se odebírají od různých druhů zvířat – skotu, prasat, koní, ovcí, králíků, drůbeže a vysoké zvěře. Analyzuje se moč, krevní sérum, maso, mléko, vajíčka.

Většina růstových stimulátorů je podávána nitrosvalově, intravenózně nebo pomocí podkožní injekce, či orálně prostřednictvím krmiv nebo vody.

Podezřelá zvířata jsou obvykle v dobrém zdravotním stavu, takže identifikace je často obtížná. Např. u látek endogenního původu, jako je např.  $\beta$ -estradiol je analyticky obtížné určit, zda je látka produkovaná endogenně nebo jestli byla podána jako růstový stimulátor [5].

## 2.2 Přírodní steroidní hormony

### 2.2.1 Androgeny

#### 2.2.1.1 Obecná charakteristika androgenů

Androgeny kromě varlat vznikají i ve vaječnících a nadledvinách. Nejvýznamnějším efektem androgenů v tělním metabolismu je stimulace syntézy bílkovin [1].

#### Biologické účinky a terapeutické použití

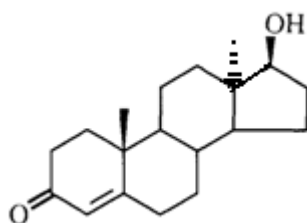
Androgeny působí na vývoj sekundárních pohlavních znaků u samců, působí na růst pohlavních orgánů a silně ovlivňují nervovou soustavu.

Androgeny vyvolávají euforii, někdy však také deprese a dysforie. Účinek je nepravidelný a často nezávislý na dávkování. Androgenů se pro jejich anabolický efekt užívá i při vývojových poruchách u dětí [1].

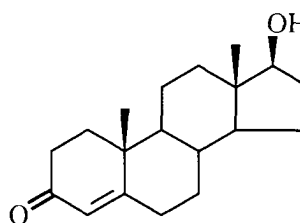
#### 2.2.1.2 Přírodní testosteron a jeho fyziologická role

##### Testosteron

( $\beta$ -testosteron - 4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one; testosterone; trans-testosterone;  $\alpha$ -testosteron – 4-androsten-17 $\alpha$ -ol-3-one; epitestosterone; cis-testosterone)



$\alpha$  – testosteron



$\beta$  – testosteron

Testosteron je mužský pohlavní hormon produkovaný především ve varlatech, malé množství je produkováno i v nadledvinách. Je syntetizován z cholesterolu. Je prekurzorem estrogenů v organismu. Testosteron a jeho metabolity, jako např. dihydrotestosteron ovlivňují

tvorbu sekundárních mužských pohlavních znaků, jako je větší množství svalů, hluboký hlas, silnější kůže, v pubertě produkuje akné.

Testosteron se používá u neoperabilních případů karcinomu prsu, a to ve vysokých dávkách [2, 7].

### **Fyziologická role testosteronu**

Testosteron, podobně jako většina dalších steroidů, proniká snadno do cílové buňky, kdy díky své rozpustnosti v tucích přímo prochází buněčnými membránami. Následným působením na specificky vázaná chromozomová místa jádra umožní tvorbu některých enzymů nebo stavebních bílkovin. V řadě částí těla (ve varlatech, v prostatě, v semenných váčcích, v játrech a v mozku) je též přeměněn enzymem 5 $\alpha$ -reduktázou na 5 $\alpha$ -dihydrotestosteron (DHT) s podobnými biochemickými účinky. V játrech a hypothalamu se může přeměnit až na hormon estradiol. Předpokládá se, že právě účinky testosteronu v příčně pruhovaném svalstvu organismu jsou uskutečněny většinou vlivem 5 $\alpha$ -dihydrotestosteronu. Testosteron a jeho strukturálně příbuzná analoga mají androgenní a anabolické vlastnosti, DHT má zejména působení androgenní. Estradiol některé tyto aktivity tlumí, jiné potencuje. Testosteron je metabolizován v játrech na DHT a androstenedion a následně na androsteron či jeden z jeho dvou isomerů, epiandrosteron nebo etiocholanon, kdy všech těchto pět metabolitů je přítomno v plasmě a v moči [1, 2, 8].

#### **2.2.1.3 Syntetický testosteron**

Synteticky připravený testosteron je jedním z nejčastěji zneužívaných hormonů ve sportu. Výborně se hodí k budování hmoty a síly. Má mimořádně silné androgenní účinky. Rychle zvyšuje agresivitu. Bohužel však testosteron silně snižuje produkci endogenního testosteronu (může ji dokonce zastavit), jeho přebytké množství se přeměňuje na estrogény, čímž velmi snadno vzniká gynekomastie, často dochází k silné retenci vody a solí (vysoký krevní tlak) a má ještě celou řadu vedlejších účinků. Ženy by jej měly vynechat úplně, neboť u nich může docházet k silným virilizačním příznakům (růst chlupů a vousů, hluboký hlas apod.).

Do těla hospodářských zvířat se vpravuje pomocí podkožního implantátu do uší v kombinaci s estradiolem a jeho estery se pak nachází ve formě jeho esteru acetátu, propionátu nebo isobutyřátu. Testosteron je nejčastěji metabolizován na méně aktivní 17 $\alpha$ -testosteron. Metabolismus testosteronu vede k jeho biologické deaktivaci [1, 2, 9].

### **2.2.2 Estrogény**

#### **2.2.2.1 Obecná charakteristika estrogenů**

Názvem estrogény označujeme jednak přirozené steroidní hormony, tvořené především ve vaječnících, jednak také synteticky připravené látky jiné struktury s tímto účinkem. Všechny estrogení hormony se vyznačují estranovým skeletem s aromatickým kruhem A, fenolovou hydroxyskupinou na C<sub>3</sub> a hydroxy- nebo ketoskupinou na C<sub>17</sub>.

Estrogení aktivita byla zjištěna i u některých rostlin (fytoestrogeny), dále v pícech a ve chmelu.

Z těla jsou estrogény vylučovány močí, většinou jako sulfáty a glukuronidy, které jsou ve vodě rozpustné. Vylučují se tak i estrogény syntetické [1, 9].



## Biologické účinky a terapeutické použití

Steroidní estrogeny se účastní přenosu vodíku mezi NADH a NADP. Bylo zjištěno, že se vážou na chromatin buněčného jádra, a to na bílkovinnou frakci, která nemá povahu histonu. Dochází tak ke stimulaci biosyntézy chromozomové i ribozomové RNA, zvláště pak m-RNA, během diferenciaci buněk vejcovodů.

Estrogeny způsobují nárůst tuku v těle. Stimulují růst dělohy. V mírných dávkách vyvolávají proliferaci děložní sliznice a řadu morfologických i funkčních změn v samičím organismu, které vedou k projevům říje u zvířat. Progesteron, testosteron nebo kortexon působí inhibičně na aktivitu estrogenů na děložní sliznici. Estrogenní hormony jsou tvořené především ve vaječnících, během gravidity jsou produkovány také placentou, zejména v pozdějších stádiích. I když je aktuální obsah estrogenů ve vaječnících nepatrný, denní produkce je dost značná a kolísá cyklicky a podle řady okolností, stáří organismu apod. Podobně je to u sekrece estrogenů placentou a nadledvinami.

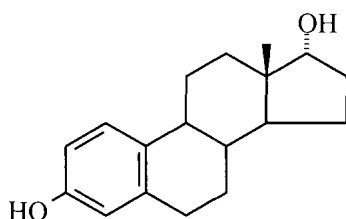
Estrogeny působí intenzivně na vývoj samičích sekundárních pohlavních znaků. Přímé ovlivnění mléčných žláz estrogeny je zřejmě po přímé lokální aplikaci s vyvoláním proliferace ve žláze. Působení estrogenů na nervovou soustavu není dosud zcela jasné.

Estrogeny jsou používány hlavně v gynekologii k úpravě funkčních menstruačních poruch a při některých klimakterických potížích. Řada estrogenů se používá také k léčení neplodnosti a k prevenci opakujících se potratů. Estrogeny se podávají i v případech pokročilého karcinomu prsu, pokud se jedná o pacientky po menopauze. Estrogeny ale spíše prodlužují dobu přežití. Ojedinele byly zkoušeny při opožděném růstu, při akutní leukemii nebo při vředové chorobě [1, 7].

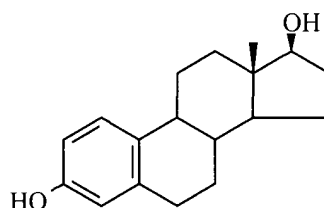
### 2.2.2.2 Estradiol a progesteron

- **Estradiol**

( $\beta$ -estradiol – 1,3,5(10)-estratrien-3,17 $\beta$ -diol; E 2;  $\alpha$ -estradiol - 1,3,5(10)-estratrien-3,17 $\alpha$ -diol; epiestradiol)



$\alpha$  – estradiol



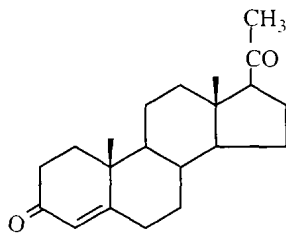
$\beta$  - estradiol

Estradiol většinou vzniká periferní aromatizací testosteronu.

Estradiol se používá na zvýšení rychlosti nárůstu tuku v těle. Kvůli případným účinkům na lidské zdraví je jeho užívání v rámci EU zakázáno.

17 $\beta$ -estradiol je zvířatům podáván ve formě podkožních implantátů do uší samostatně nebo v kombinaci s dalšími hormonálně účinnými látkami jako je progesteron nebo trenbolon acetát. 17 $\beta$ -estradiol získaný z implantátu je nerozeznatelný od endogenního estradiolu v oběhovém systému [1, 8].

- **Progesteron**  
(4-pregnen-3,20-dione)



*Progesteron*

Progesteron je u zvířat aplikován v kombinaci s estradiolem a jeho estery. Do těla je vpraven pomocí podkožních implantátů uchem. Pokud je progesteron aplikován exogenně, vstupuje do stejných metabolických drah jako progesteron produkovaný endogenně. V játrech ošetřených zvířat, zejména skotu a telat, byly hlavní metabolity progesteronu identifikovány jako 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -pregnan-20-one, 5 $\beta$ -pregnan-3 $\alpha$ ,20 $\beta$ -diol. V ledvinách byl identifikován jako 20 $\beta$ -hydroxy-ypregnan-4-en-3-one, 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one, 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one a 5 $\alpha$ -pregnan-3 $\beta$ ,20 $\beta$ -diol. Ve svalech a tuku byly prokázány hydroxylované metabolity, které představují menší frakce a mají značně zmenšenou biologickou aktivitu [7, 9].

## 2.3 Syntetické steroidní sloučeniny

### 2.3.1 Obecná charakteristika syntetických steroidů

Syntetické steroidní sloučeniny, též anabolické steroidy, jsou odvozené od mužského pohlavního hormonu testosteronu. Mají zvýrazněný stimulační účinek na syntézu bílkovin, zvláště pak svalových tkání. Steroidy s anabolickými androgenními účinky jsou aplikovány u zvířat i u lidí z jediného důvodu – za účelem nárůstu svalové hmoty a síly. Používání anabolických steroidů je ovšem zakázáno nejen při výkrmu hospodářských zvířat, ale i ve sportu. Některá anabolika jsou ovšem schválená pro svoje léčebné účinky. Jedná se zejména o trenbolon acetát a melengestrol acetát, boldenon, chlormadinon acetát, ethylenestrol, fluoxymesteron, medroxyprogesteron acetát, megestrol acetát, methandienon, methylboldenon, methyltestosteron, drostanolon, norethandrolon, norgestomet, norgestrel, nortestosteron, nortestosteron decanoát, oxymetholon a stanozolol [2, 25, 49].

### 2.3.2 Historie syntetických steroidů

Již ve starověku bylo známo, že varlata úzce souvisí s pohlavní funkcí mužů, kdy po jejich odstranění se ztrácí síla, agresivita a další typické charakterové vlastnosti. V minulém století vyzkoušeli poprvé Koch s Kenyonem pozitivní účinky extraktu býčích varlat na svých pacientech a v roce 1935 byl Laquerem izolován čistý testosteron. Současně v tomto období, t.j. před II. světovou válkou, Kochajian a Murlin v Německu zkoumali působení testikulárních hormonů na svalovou hmotu, čímž byl dán základ ke zneužití anabolik pro zvýšení lidské výkonnosti. Podle materiálů Světové zdravotnické organizace byl testosteron pravděpodobně

"využit" již během války pro zvýšení agresivity německých vojáků. Na olympijských hrách v Helsinkách v roce 1952 bylo již veřejně rozšířeno, že někteří sportovci užívají steroidy. Rozhodujícím důvodem byly zejména výsledky vzpěračů bývalého Sovětského svazu.

Později se objevilo velké rozšíření užívání anabolik mezi sportovci, které přetrvává do současnosti [2].

### 2.3.3 Příjem syntetických steroidů

- **Orálně:**

Orální anabolické steroidy se po vstřebání v tenkém střevě dostávají do portálního krevního oběhu, kterým jsou přenášeny do jater. Aby nedošlo k jejich okamžité deaktivaci (hydrolýze), musela být v molekule steroidu C-17 provedena substituce methylovou skupinou. Biologická aktivita těchto steroidů je poměrně krátká a trvá pouze několik hodin [25].

- **Injekčně:**

Vazba alkoholové skupiny steroidu s mastnou kyselinou v pozici na C-17 způsobuje jeho zvýšenou odolnost a delší biologickou aktivitu, kdy právě délka působení jednotlivých preparátů je závislá na druhu mastné kyseliny. Pro anabolické steroidy a androgeny to může být acetát, propionát, fenylpropionát, enanthát, dekanoát a cypionát. Biologická aktivita se zvyšuje úměrně s pořadím tak, jak jsou mastné kyseliny postupně navázány. Z důvodu vhodného pozdního nástupu účinku některých derivátů testosteronu byly u preparátů použity kombinace různých esterů, čímž se dosáhlo rovnoměrnějšího rozložení jejich biologické aktivity [50].

### 2.3.4 Syntetické steroidy a poškození zdraví

Anabolické steroidy způsobují poškození [25]:

#### **Kardiovaskulární a hematologické změny**

- vyšší hodnoty krevního tlaku
- kardiomyopatie (patologické zvětšení svaloviny srdce)
- poruchy srdečního rytmu
- onemocnění koronárních cév
- cévněmozková onemocnění

#### **Poškození jater**

- poškození jaterních buněk s jejich hypertrofií
- benigní tumory
- tvorba cyst s rizikem jejich ruptury

### **Změny sekundárních pohlavních charakteristik a poruchy reprodukčního systému**

- poruchy libida
- neplodnost
- poškození genetického materiálu s rizikem poškození plodu
- gynekomastie u mužů
- virilizační účinky:
  - u mužů vypadávání vlasů, akné
  - u žen zhrubnutí hlasu, vypadávání vlasů, poruchy menstruace
  - přestavba skeletu na typ s mužskými charakteristikami

### **Změny vazivové tkáně**

- poranění svalů a vazů

### **Změny chování a poruchy psychických funkcí**

- nespavost a neklid
- agresivita a násilné chování
- paranoické přeludy
- panický strach
- sebevražedné tendence
- kriminální delikty včetně vražd

### **Nádorová onemocnění**

- nádorová onemocnění jater
- nádorová onemocnění ledvin
- nádorová onemocnění varlat
- nádorová onemocnění prostaty

### **Poruchy regulace glukózy**

- vzestup inzulinové rezistence

### **Změny imunitního systému**

- pokles hodnot imunoglobulinů IgA a IgG se snížením obranyschopnosti organismu

### **Nepřímé následky zneužití steroidů**

- přenos parentálních onemocnění včetně AIDS
- tkáňové poškození při injekční aplikaci
- zdravotní rizika při kombinaci s dalšími drogami
- faktor zvýšeného příjmu dalších drog
- použití neznámých steroidů způsobujících zdravotní komplikace

### 2.3.5 Využití syntetických steroidů v léčbě

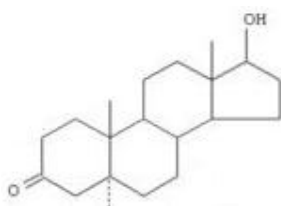
Anabolické androgenní steroidy jsou úspěšně klinicky využívány v léčbě celé řady závažných onemocnění, kam patří zejména [25]:

- **náhradní terapie u mužů** – steroidy mohou být aplikovány ke stimulaci pohlavního vývoje v případech opožděného nástupu dospívání.
- **náhradní terapie u žen** – produkce testosteronu je nezbytná i u žen. Vzácněji se u mladých dívek objevuje pohlavní infantilismus, způsobený selháním estradiolu, progesteronu a testosteronu. K léčbě se používá právě testosteron.
- **gynekologické poruchy** – příležitostně se používají při léčbě gynekologických poruch, i když jejich dlouhodobější příjem vede k některým vedlejším nepříznivým účinkům (např. nepravidelná menstruace). Bývají často použity k potlačení laktace či v terapii neoperabilních a metastázujících nádorů prsou.
- **metabolismus bílkovin** – jejich anabolizující funkce se využívala po závažných chirurgických operacích. Aplikace u stavů podvýživy byla provedena poprvé u osvobozených vězňů německých koncentračních táborů.
- **anémie** - steroidy bývají často využity při léčbě anémií rezistentních na jinou terapii.
- **osteoporóza** – některé pozitivní výsledky ukazují na účinnost nízkých dávek estrogen/androgenní kombinované terapie osteoporózy zejména u žen po klimakteriu a při léčbě dalších degenerativních poruch kostního aparátu.
- **stimulace růstu** – steroidy mohou být použity u předpubertálních chlapců ke stimulaci růstu a k jejich normálnímu pohlavnímu vývinu. I když podporují růst, vedou i k rychlejšímu uzávěru růstových plotének dlouhých kostí s malou konečnou tělesnou výškou jedince jako důsledkem léčby.
- **poškození pohybového systému a poúrazové stavy**

### 2.3.6 Zástupci syntetických steroidů

#### Androstanolon

(5 $\alpha$ -androstan-17 $\beta$ -ol-3-one; dihydrotestosteron; allodihydrotestosteron)

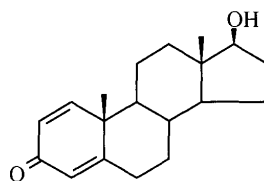


*Androstanolon*

Androstanolon je téměř identický s tělu vlastním dihydrotestosteronem, který vzniká při periferní konverzi testosteronu. Z těchto důvodů bývá někdy označován jako syntetický dihydrotestosteron. Tento steroid vykazuje především androgenní účinky [5, 9].

### Boldenon

(1-dehydrotestosteron; 1,4-androstadien-17 $\beta$ -ol-3-one)

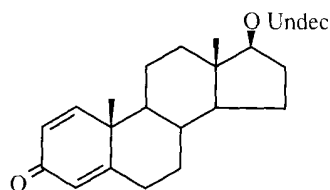


*Boldenon*

Boldenon je androgenní steroid se známými anabolickými účinky. Způsobuje pomalejší, ale kvalitnější nárůst svalů, ve srovnání s normálně rychle rostoucími svaly, které se dají očekávat od testosteronu. Boldenon zůstává v organismu aktivní po delší dobu než většina steroidů. Je legálně dostupný jen na veterinárních klinikách [9].

### Boldenon undecylenat

(1,1-androstadien--17 $\beta$ -ol-3-one undecylenate; 1-dehydrotestosteron undecylenate)

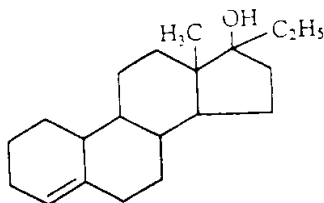


*Boldenon undecylenat*

Účinná látka boldenon undecylenat se dnes již vyskytuje pouze ve steroidech pro veterinární medicínu. U žen zvyšuje činnost mazových žláz a z toho plynoucí akné, zvyšuje libido a v ojedinělých případech zesiluje růst chlupů na nohou i v obličeji [9].

### Ethylestrenol

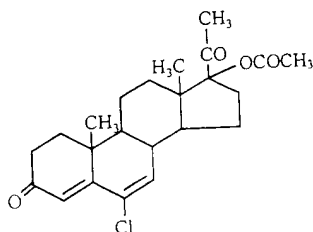
(19-nor-17 $\alpha$ -pregn-4-en-17-ol)



*Ethylestrenol*

Ethylestrenol je velmi mírný, orální steroid. Je to především anabolicky účinný steroid, který vykazuje jen velmi slabé androgenní vlastnosti. Přesto může při vysokém dávkování a dlouhodobém podávání způsobit zvýšení hodnot jaterních testů [9].

### Chlormadinon (acetát)

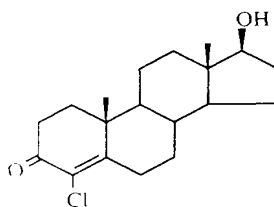


*Chlormadinon (acetát)*

Jedná se o syntetický progestagen používaný na zabránění nebo potlačení ovulace [9].

### Chlortestosteron

(4-androsten-4-chloro-17 $\beta$ -ol-3-one; clostebol)

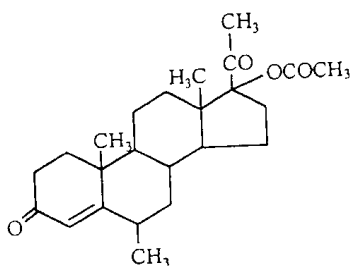


*Chlortestosteron*

Chlortestosteron je steroid, který je u hospodářských zvířat biotransformován na řadu metabolitů. Hlavní metabolity přítomné v moči jsou 4-chlorandrost-4-en-3,17-dion, 4-chlorandrost-4-en-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diol a 4-chlorandrost-4-en-3-ol-17-on [9].

### Medroxyprogesteron (acetát)

(4-pregnen-6 $\alpha$ -methyl-17-ol-3,20-dione acetate; depo-provera; 17 $\alpha$ -hydroxy-6 $\alpha$ -methyl-4-pregnene-3,20-dione 17 $\alpha$ -acetate)

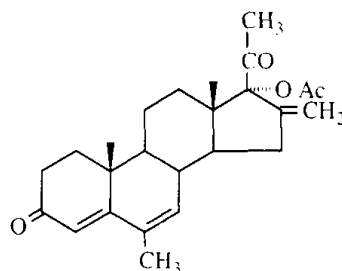


*Medroxyprogesteron (acetát)*

Medroxyprogesteron je syntetický dlouhodobě působící progestagen příbuzný s progesteronem. Má ovšem 20-30 krát větší schopnost potlačit ovulaci u zvířat než progesteron [9].

### Melengestrol (acetát)

(4,6-pregnadien-6-methyl-17-ol-3,20-dione acetate)

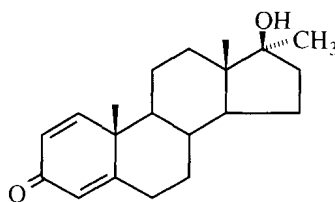


*Melengestrol (acetát)*

Melengestrol je syntetický progestogen, efektivní jako růstový stimulátor zejména u jalovic. Jeho progestagenní aktivita je asi 125 krát vyšší než v případě progesteronu. Melengestrol a jeho metabolity jsou z těla vylučovány výkaly [9].

### Methylboldenon

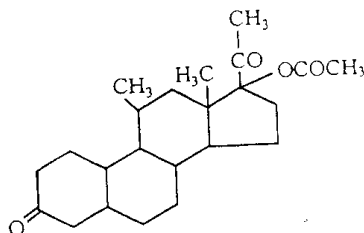
(1,4-androstadien-17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -ol-3-one; dianabol; 1-dehydromethyltestosterone)



*Methylboldenon*

Methylboldenon patří mezi androgeny, je podobný 17 $\alpha$ -methyltestosteronu [9].

### Norgestomet



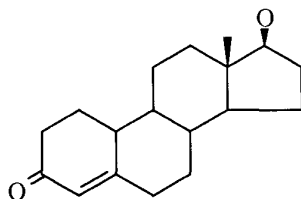
*Norgestomet*

Norgestomet je syntetický derivát progesteronu [9].



### Nortestosteron

(4-estren-17 $\beta$ -ol-3-one; 17 $\beta$ -hydroxy-19-norandrost-4-en-3-one; nandrolone; 19-nor-4-androsten-17 $\beta$ -ol-3-one)



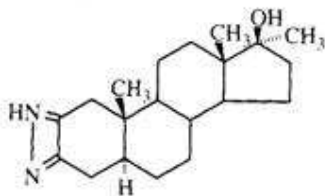
$\beta$  - nortestosteron

Použití nortestosteronu a jeho derivátů je zakázané. Zneužití může být detekováno díky nálezů injekčních vpichů při porážce zvířete nebo také pomocí monitorování 17 $\beta$ -19-nortestosteronu a jeho 17 $\alpha$ -epimeru ve žluči a moči. Aby se někteří farmáři vyhnuli nálezů míst po vpichu při kontrole u porážky zvířat, provádějí několikanásobné drobné vpichy malého množství nortestosteronu na tmavých, neviditelných místech kůže zvířat.

Zpočátku se mělo za to, že nortestosteron se nemůže vyskytovat přirozeně. Následně se zjistilo, že může být přirozeně produkován nejen u březích ovcí, krav a srn, ale i u kanců, hřebců, mladých telat. Přítomnost 17 $\alpha$ -nortestosteronu u dobytka mužského rodu může být způsobena zvýšeným stresem, vyvolaným např. poraněním [9, 53].

### Stanozolol

(5 $\alpha$ -androstan-17 $\alpha$ methyl-17 $\beta$ ol-[3,2-c]pyrazole; stanozol)

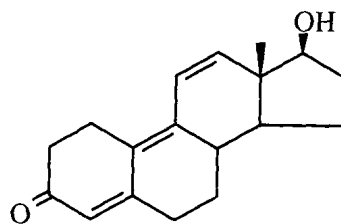


Stanozolol

Stanozolol je androgenní anabolický steroid používaný např. při osteoporóze. Přestože je zakázaný, bývá často zneužit sportovci i farmáři jako růstový stimulátor. V moči ošetřených zvířat se kromě stanozolu našly i jeho metabolity – 16-hydroxystanozolol v případě orálního použití, nebo dva hydroxylované metabolity, a to 16-hydroxystanozolol a 4,6,-dihydroxystanozolol, v případě podkožního použití [3, 9].

### **Trenbolon**

(4,9,11-estratrien-17 $\beta$ -ol-3-one)

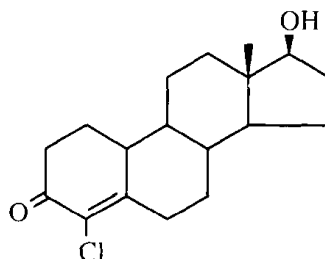


*Trenbolon*

Trenbolon je syntetický steroid podobný testosteronu, ale s vyšší anabolickou aktivitou. Po podání hospodářským zvířatům je rychle metabolizován na jeho tři hydroxylované formy. 17 $\beta$ -OH epimer je hlavní metabolit působící ve výkalech, žluči, játrech, zatímco jeho 17 $\alpha$ -OH epimer, který má 1/10 hormonální aktivity 17 $\beta$ -OH epimeru je hlavním metabolitem ve svazech [9, 53].

### **Norclostebol**

(4-estren-4-chloro-17 $\beta$ -ol-3-one, 4-chloro-19-nortestosterone)

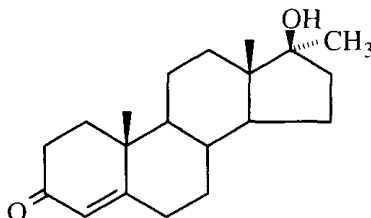


*Norclostebol*

Norclostebol se na černém trhu objevil poprvé v roce 1990. Jeho nejčastější metabolity jsou 4-chloro-19-norandrostan-3 $\epsilon$ -ol-17 $\epsilon$ -on a 4-chloro-19-norandrostan-3 $\epsilon$ -17 $\epsilon$ -diol.

### **Methyltestosteron**

(4-androsten-17 $\alpha$ -methyl-17 $\beta$ -ol-3-one)

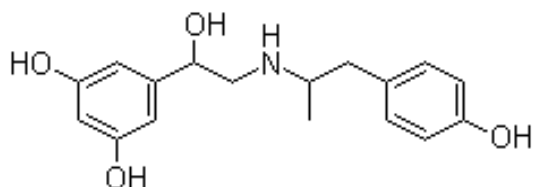


*Methyltestosteron*

Methyltestosteron představuje orální formu testosteronu. Řadí se mezi velmi účinné steroidy, protože vykazuje výrazné androgenní účinky. Používá se především za účelem zvýšení agresivity. Methyltestosteron je velmi toxický steroid, který může vyvolávat celou řadu vedlejších účinků. Způsobuje těžké zatížení jater.

## 2.4 Další zajímavé látky skupiny A

### Beta-agonisté



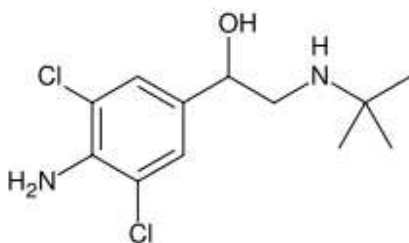
*Fenoterol*

Beta-agonista je agonista beta-adrenoreceptoru. Beta-agonisté mají důležitou funkci ve tkáních, zvláště pak v srdeční svalovině, v hladké svalovině průdušek, v játrech, v ledvinách. Celkovým účinkem beta-agonistů je srdeční stimulace (zvýšená srdeční rychlost, srážlivost krve) a systémové rozšíření cév. Beta-agonisté mohou navodit tkáňovou hypertrofii snížením svalové degradace a tukové syntézy. Výsledkem je, že se modifikuje poměr svalů k tuku se zlepšením růstu. Tyto látky také stimulují funkce sympatického nervového systému a ovlivňují tak řadu pochodů v lidském těle. Byly vyvinuty pro léčbu chronické bronchitidy, rozedmy plic a astmatu, kdy uvolňují hladké svaly průdušek. K jejich potenciálním škodlivým vedlejším účinkům patří neklid, pocity úzkosti, svalový třes a poruchy srdečního rytmu a zvýšený srdeční tlak.

Použití beta-agonistů jako růstových stimulátorů je zakázané, výjimkou je jejich použití pro léčebné účely, které ale podléhá přísné veterinární kontrole [3].

### Clenbuterol

(4-Amino- $\alpha$ -[(tert-butylamino)methyl]-3,5-dichlorbenzylalkohol)



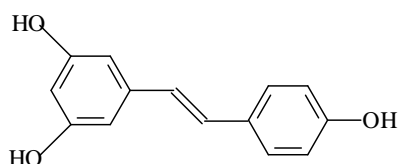
*Clenbuterol*

Clenbuterol je schválený beta-agonista pro specifické léčebné účely (zejména u koní a krav). Nejedná se o anabolicko-androgenní steroid, nýbrž o antikatabolickou látku, nemá tedy ani žádné vedlejší účinky steroidního charakteru. Navíc clenbuterol způsobuje termogenezi - zvyšuje tělesnou teplotu a jako "palivo" pro tuto činnost využívá podkožní tuk. Pokud je užíván současně s anabolickými steroidy, tak svým výrazným antikatabolickým účinkem jejich účinky ještě zvýrazňuje. Clenbuterol účinně pomáhá tlumit silnou katabolickou fázi, která nevyhnutelně nastává po vysazení anabolik [9].

### Ractopamin

Ractopamin není povolený v EU, v USA ale ano, kde se podává ve formě veterinárního léčiva do krmiv pro prasata bez jakékoliv veterinární kontroly [9].

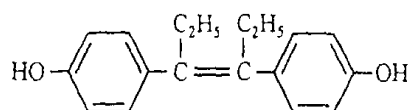
### Stilbeny



*Resveratrol*

Stilbeny patří mezi fytoestrogeny. Fytoestrogeny jsou fenoly, jejichž struktura se podobá steroidním hormonům. Přirozeně se vyskytující stilbeny jsou substituované sloučeniny s dvěma benzenovými kruhy spojenými alifatickým dvouuhlíkatým řetězcem, se strukturou C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>. Vyskytují se jako volné sloučeniny nebo jako glykosidy (převážně v rostlinách). Ve fermentované potravě se nacházejí ve formě aglykonů. Uplatňují se například jako antimikrobní látky. Nejznámějším stilbenem je resveratrol. Má 2 izomery, cis a trans, z nichž pouze trans má estrogení účinky [9, 14].

### Diethylstilbestrol



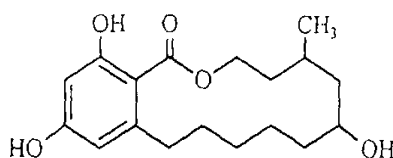
*Diethylstilbestrol*

Diethylstilbestrol je známá nesteroidní karcinogenní látka patřící mezi stilbeny. Diethylstilbestrol, a další stilbeny - hexestrol a dienestrol - jsou genotoxické, obtížně metabolizovatelné sloučeniny, které jsou považované za schopné nevratně zahájit karcinogenní procesy, dokonce i v malých koncentracích. Použití diethylstilbestrolu a dalších hormonálních stilbenů je zakázané [9].

## Thyreostatické látky

Největší význam mají heterocyklické sloučeniny, které obsahují ve své molekule zbytek thiomočoviny. Významné jsou thiouracily, jejichž reprezentantem je např. 4-methyl-2-thiouracil, který vykazuje vysoký thyreostatický účinek. Účinnějšími sloučeninami jsou merkaptimidazoly, jako je 1-methyl-2-merkaptimidazol [3].

## Zeranol

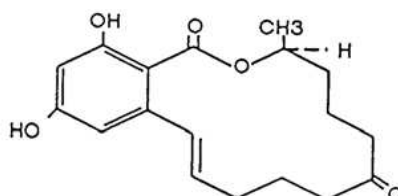


*Zeranol*

Zeranol je estrogenní sloučenina s vlastnostmi růstového stimulantu. Nevyskytuje se přirozeně. Zeranol je semisyntetický estrogen připravený průmyslově redukcí zearalenonu, který je jeden ze tří příbuzných toxinů produkovaných plísní *Fusarium*. Dávkování se provádí podkožními implantáty. Implantát se používá buď samostatně, nebo v kombinaci s dalšími hormonálně účinnými látkami. U savců je zeranol je metabolizován v ledvinách hlavně na zearalanon a taleranol.

Zeranol se ovšem výjimečně vyskytnul přirozeně u zvířat, která zkonzumovala obilí kontaminované plísní *Fusarium* [3, 9].

## Zearalenon



*Zearalenon*

Mykotoxin zearalenon je z hlediska chemické struktury lakton kyseliny  $\beta$ -resorcylové. Zearalenony produkují zejména toxigenní kmeny rodu *Fusarium*. Hlavním druhem v jejich produkci je *Fusarium graminearum*, která napadá krmivářské a potravinářské obilí a je schopna produkovat až 1900  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  toxinu v sušině.

Vzhledem ke své chronické toxicitě představuje zearalenon zdravotní riziko pro člověka i pro hospodářská zvířata. Zearalenon je ve skladovaných komoditách velmi stabilní a jeho koncentrace se výrazně nemění ani po tepelném zpracování či fermentaci.

Zearalenon byl nalezen např. v obilovinách a výrobcích z nich – ječmeni, sladu, pivu, kukuřici, ovsu, pšenici a dále v ořechách, banánech, i v koření, olejích apod.

Zearalenon může být u zvířat, eventuálně člověka metabolizován na  $\alpha$  a  $\beta$ -zearalenol [3, 11].

## 2.5 Veterinární léčiva

Výroba kvalitních a hygienicky nezávadných potravin živočišného původu předpokládá zajištění dobrého zdravotního stavu hospodářských zvířat. Proto se jejich chov neobejde bez používání veterinárních léčiv. Veterinární léčiva jsou farmakologicky a biologicky aktivní chemické látky určené k léčbě, prevenci a diagnostice chorob u zvířat.

V posledních letech dochází ke stále se zvyšujícímu používání léčiv v živočišné výrobě z důvodu silnějšího šíření nakažlivých onemocnění. Ve snaze o vysokou produktivitu docházelo často i k nahrazování nedostačujících hygienických podmínek zvýšeným používáním veterinárních léčiv s cílem preventivně zabránit zhoršování zdravotního stavu hospodářských zvířat. Přívod veterinárních léčiv do těla hospodářských zvířat nutně vede k výskytu jejich reziduí ve svalovině, různých orgánech, mléku a vejcích, takže stopová množství veterinárních léčiv se mohou také nacházet v mase, v masných, mléčných výrobcích i dalších.

Z hlediska kvality potravin se veterinární léčiva považují za cizorodé, kontaminující látky, jejichž přítomnost je nežádoucí, i když často nevyhnutelná. V této souvislosti jsou tyto látky řazeny do stejné skupiny jako kontaminanty ze životního prostředí (mykotoxiny, PCB, pesticidy a jiné). Stejně jako ostatní typy kontaminantů, rezidua léčiv v potravinách představují potenciální zdravotní riziko pro konzumenty. Proto je třeba výskyt a hladiny reziduí veterinárních léčiv ve tkáních účinně a neustále regulovat [3, 12, 26].

### Správné použití veterinárních léčiv

V EU je v současnosti přihlášeno k registraci nebo registrováno k používání přibližně 700 farmakologicky nebo biologicky účinných sloučenin. Nesmí se používat žádný veterinární preparát, který by nebyl posouzen z hlediska nezávadnosti reziduí a pro který nebyla navržena hodnota MRL. Pro používání většiny veterinárních farmak se předepisují tzv. ochranné lhůty, tj. doba, která musí uplynout mezi posledním podáním léčiva a porážkou zvířete nebo sběrem mléka a vajec. Délka ochranné lhůty se může pohybovat mezi několika dny až týdny.

V poslední době se množí důkazy o tom, že nadměrné používání léčiv ve veterinární medicíně vede k některým nežádoucím účinkům, a to zvláště v případě antibiotik. Jejich nadměrné užívání může mít za následek rezistenci patogenních mikroorganismů, potlačení fyziologické střevní mikroflóry nebo vznik různých alergií [3, 26].

## 2.6 Legislativní požadavky

### 2.6.1 Platná legislativa

Česká republika, stejně jako ostatní členské státy EU, mají zákaz používání látek majících hormonální nebo thyreostatický účinek a beta-agonistů pro stimulaci růstu, nicméně mohou být použity ve vymezených indikacích pro terapeutické účely. Do českého právního řádu se plně podařilo legislativu EU implementovat (za což má odpovědnost ÚSKVBL jako státní autorita v oblasti veterinárních léčiv v ČR za dozoru evropské lékové agentury EMA) [52].

Roku 1981 legislativa Evropské Unie směrnicí 81/602/EEC zakázala užití určitých hormonálně účinných látek. Jednalo se o diethylstilbestrol a další stilbeny a thyreostatické látky.

V roce 1988 Evropská Unie zakázala užívání dalších 6 hormonů pro podporu růstu zvířat, a to 17 $\beta$ -estradiolu, testosteronu, progesteronu, zeranolu, trenbolonu (acetátu) a melengestrolu (acetátu) [5].

V zemích EU je tedy zakázáno jak neterapeutické používání anabolických látek v chovech hospodářských zvířat, tak i import masa ze zvířat jimi ošetřených. Evropská Unie se takto rozhodla na základě obav spotřebitelů ohledně bezpečnosti a zdravotní nezávadnosti potravin. Zákaz importu, který vešel v platnost 1.1.1989, se mimořádně dotkl Spojených států amerických, kde jsou anabolika (včetně hormonů) rozsáhle používána v chovu hospodářských zvířat. Výsledkem bylo, že Spojené státy nemohly vyvážet hovězí a telecí maso určené pro lidskou spotřebu do EU. Nakonec EU povolila import masa z USA, pokud má certifikaci, že zvířatům nebyla anabolika podána [9].

Dne 9. března 1995 zdůraznil Evropský parlament naléhavou potřebu jednotného a účinného monitorovacího systému ve Společenství a požádal členské státy o posílení kontroly a sledování s ohledem na použití nedovolených látek.

Dne 29. dubna roku 1996 vydala Rada 2 směrnice, a to 96/22/EC a 96/23/EC, které rušily předchozí směrnice (v případě 96/22/ES jsou to směrnice: 81/602/EHS, 88/146/EHS a 88/299/EHS; u 96/23/ES se jedná o: 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS) a ustanovovaly legální rámec pro kontrolu reziduí v potravinách zvířecího původu [9].

Směrnice 96/22/EC zakazuje užití beta-agonistů a určitých látek, které mají hormonální nebo thyreostatické účinky. Tato směrnice ovšem umožňuje užití určitých, Evropskou Radou schválených, veterinárních léčiv obsahujících hormony (např. 17- $\beta$ estradiol, testosteron, progesteron a jejich deriváty) pro terapeutické účely. Umožňuje tedy podávat hospodářským zvířatům veterinární léčiva s estrogením, gestagením nebo androgením účinkem pro zootechnické účely, tj. synchronizaci říje. Maso nebo produkty ze zvířat, kterým byly podány tyto látky, smějí být uváděny na trh pro lidskou spotřebu, pokud byla dotyčná zvířata ošetřena veterinárními léčivy vyhovujícími požadavkům směrnice a pokud byly dodrženy ochranné lhůty před porážkou zvířete [33].

Směrnice 96/23/EC stanovuje opatření, které členskými státy EU ukládá povinnost monitorovat látky a jejich rezidua u zvířat i zvířecích produktů. Všechny členské státy si tak mají sestavit plán pro detekci skupin reziduí nebo látek podle typu zvířete [34].

Mimo to je důležitá směrnice z 12. dubna roku 2002, a to 2002/657/EC, která implementovala směrnici 96/23/EC a vztahuje se k provedení jednotlivých analytických metod a interpretaci dosažených výsledků. Stanovuje pravidla metod používaných pro testování vzorků a specifikuje obecná kritéria pro interpretaci výsledků [31].

V ČR se touto problematikou zabývá vyhláška č. 291/2003 Sb., o zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o sledování (monitoringu) přítomnosti nepovolených látek, reziduí a látek kontaminujících, díky kterým by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí. Dle vyhlášky 291/2003, §17(2) přísluší laboratoři ÚSKVBL kontrolovat látky skupiny A – Látky s anabolickým účinkem a nepovolené látky skupiny B 2d [35].

### **2.6.2 Maximální limity reziduí (Maximum residue limits, MRL)**

Hodnocení rizika z veterinárních léčiv a růstových stimulátorů v potravinách a zavádění účinných opatření ke snižování tohoto rizika se v posledních letech věnuje stále vyšší pozornost jak na národní úrovni, tak i v mezinárodních organizacích.

Pro jednotlivá veterinární léčiva jsou určeny hodnoty maximálních reziduálních limitů (MRL), reprezentující mezinárodně všeobecně přijímanou hranici, která udává, jaká množství reziduí léčiv a stimulátorů se mohou v potravinách živočišného původu vyskytnout. Při studiu eliminace reziduí z orgánů se kromě mateřské sloučeniny musí vždy sledovat všechny farmakologicky aktivní metabolity. Podle výskytu reziduí v organismu se MRL stanovují pro maso a jednotlivé požitelné orgány, např. játra a ledviny. Zvláštní MRL se stanovují také po ryby, mléko, vejce a med [3].

Systém kontroly hladin reziduí veterinárních léčiv v surovinách živočišného původu je zakotven ve Směrnici 96/23/ES Rady EU, která je také závazná pro ČR. Směrnice předepisuje, které typy veterinárních farmak je nutno kontrolovat, u kterých druhů zvířat a v jakých primárních živočišných produktech (maso, mléko, vejce atd.) Seznam kontrolovaných látek zahrnuje jak léčiva povolená k používání, tak nepovolené (nelegálně používané) přípravky. V posledních letech byla vedle velkých hospodářských zvířat zařazena do systému kontroly také drůbež, ryby a králíci. Jednotlivé členské země jsou povinny rok předem předložit podrobný národní plán kontroly ke schválení v EU. Odpovědným kontrolním pracovištěm v ČR je Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv v Brně [3].

Všechna veterinární léčiva na evropském trhu určená pro hospodářská zvířata musí být toxikologicky hodnocena a podle typu MRL zařazena do některé z příloh I-IV vyhlášky 2377/90/EEC. Příloha I obsahuje s konečnou platností přijaté MRL, zatímco přechodné limity v příloze III se uvádějí pro látky, pro které byly vyžádány doplňující údaje. Příloha II obsahuje farmaka, která byla posouzena jako neškodná pro zdraví konzumenta a tudíž nevyžadující určení MRL (např. vitamíny a jiné běžné součásti potravy nebo látky, které se nevstřebávají ze zažívacího traktu). V příloze IV jsou látky, pro které nebylo možno jistotou prokázat nezávadnost pro zdraví konzumenta [9].

Od 1.1.2000 se nesmí v žádném členském státu EU používat veterinární preparát, který nebyl posouzen z hlediska nezávadnosti reziduí a pro který není navržena nebo ustanovena hodnota MRL. Toto ustanovení je závazné také pro ČR. Hodnoty MRL pro povolená veterinární farmaka v ČR jsou specifikovány ve vyhlášce č. 298/1977 Sb., zákona č. 110/1997 Sb., o potravinách a tabákových výrobcích [52].

### **2.6.3 Minimální požadované limity analytické metody (Minimum required performance limit, MRPL)**

Minimální požadované pracovní limity platí pro farmakologicky účinné látky, pro něž nebyly stanoveny maximální limity reziduí, zejména pro látky, které se nepoužívají jako veterinární léčivé přípravky nebo látky, které jsou v EU zakázány, avšak v zahraničí mohou být zcela legálně používány.



Udávají nejmenší obsah analytu ve vzorku, který ještě může být detekován. Ze steroidů se limity týkají jen medroxyprogesteron acetátu [32].

## **2.7 Validace metody**

Validace je proces, při němž se určuje vhodnost použití daného analytického systému pro získání relevantních dat, tzn. zda jsou parametry metody srovnatelné s požadavky na výsledky.

Je to získání důkazu, který poskytuje vysoký stupeň jistoty, že určitý proces bude trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci [18].

### **2.7.1 Charakteristika validačních parametrů [18, 24, 49]**

#### **Konfirmace identity**

Konfirmace znamená, že měřená odezva analytického signálu může být přiřazena danému analytu, a že nepochází od interferujících složek. Používá se jak v kvalitativní, tak i kvantitativní analýze.

#### **Selektivita**

Selektivita je definována jako schopnost přesného a správného určení analytu i v přítomnosti interferujících složek. Selektivní metoda je tedy taková metoda, která za určitých podmínek umožňuje přesné a správné stanovení obsahu složky ve vymezené směsi jiných složek. Selektivita analytické metody je testována porovnáním výsledků vzorků standardů s výsledky vzorků s matricí.

#### **Linearita**

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. odezvou detektoru a koncentrací stanovované látky.

#### **Citlivost**

Citlivost je definována jako rozdíl v koncentraci analytu, který odpovídá nejmenšímu rozdílu, jenž může být detekován při odezvě instrumentální metody. Nejčastěji se stanovuje metodou nejmenších čtverců, kdy hledáme takové parametry funkce  $f$ , pro které je součet čtverců odchylek vypočtených hodnot od naměřených hodnot minimální.

#### **Mez detekce**

Je obecně nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno, ale které nemusí být stanovitelné jako exaktní hodnota. Vymezuje tedy použitelnost analytické metody.

#### **Mez stanovitelnosti**

Je nejnižší koncentrace analytu, která může být stanovena s přijatelnou mírou správnosti a přesnosti. Mez stanovitelnosti by měla být zjištěna s použitím vhodných etalonů.

#### **Robustnost**

Při robustnosti se určuje matematicko-statistickým postupem, jak je analytický signál závislý na malých změnách parametrů charakterizujících analytický postup.

Je experimentálně zjišťována pomocí záměrného vnášení změn do metody a zkoumání jejich důsledků. Udává schopnost metody poskytovat přijatelné výsledky měření i v případě, že dojde k malým odchylkám od měřicího postupu či složení vzorku. Obecně je třeba brát v úvahu velké množství faktorů, ale protože většina z nich má zanedbatelný vliv, mění se obvykle několik faktorů zároveň. Běžně se testují změny podmínek jako je stáří kolony, typ kolony, teplota kolony, pH mobilní fáze a činidla. Robustnost má být testována laboratorně, která metodu zavádí, dříve, než ji budou používat ostatní laboratoře.

### **Správnost**

Správnost metody je mírou těsnosti získané hodnoty a skutečné hodnoty obsahu analytu. Lze ji získat analyzováním referenčního materiálu. Tam, kde není vhodný referenční materiál dostupný, může být odhad správnosti získán metodou standardního přídatku chemických etalonů. Správnost může být také určena porovnáním s výsledky, které byly získány konečnou metodou, dalšími alternativními postupy nebo cestou srovnávacích studií.

### **Přesnost**

Přesnost analytické metody je údaj o míře těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky zkoušek a je obvykle uváděna jako odhad směrodatné odchylky nebo relativní směrodatné odchylky. Obecně je závislá na koncentraci analytu.

### **Opakovatelnost**

Je míra těsnosti souhlasu vztahující se k měřením prováděným za opakovatelných podmínek, tj. stejná metoda, stejný materiál, stejný pracovník, stejná laboratoř, za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku.

### **Reprodukovatelnost**

Je typ přesnosti vztahující se k měřením provedeným za podmínek reprodukovatelnosti tj. stejná metoda, jiný pracovník, jiná laboratoř, atd. Je to těsnost shody mezi výsledky měření téže veličiny v případě, že jednotlivá měření jsou prováděna při různých podmínkách.

### **Výtěžnost**

Udává schopnost měřicí metody / postupu postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku. Je mírou účinnosti dané metody.

## **2.7.2 Validační parametry dle platné legislativy EU [31]:**

### **Limit rozhodnutí (Decision limit, $CC_{\alpha}$ )**

Limit rozhodnutí je limit analytické metody, který určuje s pravděpodobností  $1 - \alpha$ , zda zkoušený vzorek je nevyhovující.

Chybou alfa ( $\alpha$ ) se rozumí pravděpodobnost, že zkoušený vzorek je vyhovující, ačkoli byla naměřena hodnota dosahující nebo překračující limit rozhodnutí (falešně pozitivní výsledek).

Pro konfirmační stanovení musí chyba  $\alpha$  dosahovat nejvýše hodnoty 0,01 (1%).

### **Detekční schopnost (Detection capability, CC $\beta$ )**

Detekční schopností se rozumí nejmenší množství látky, které může být s nejistotou  $\beta$  ve vzorku detekováno, identifikováno a/nebo kvantitativně stanoveno. V případě látek, pro něž není stanovena nejvyšší přípustná hodnota, je detekční schopností nejnížší koncentrace, při níž lze metodou identifikovat skutečně kontaminované vzorky se statistickou spolehlivostí  $1 - \beta$ . V případě látek, pro něž je stanovena nejvyšší přípustná hodnota, se detekční schopností rozumí koncentrace, při jejímž dosažení lze metodou detekovat nejvyšší přípustné koncentrace s pravděpodobností  $1 - \beta$ .

Chybou beta ( $\beta$ ) se rozumí pravděpodobnost, že zkoušený vzorek je ve skutečnosti nevyhovující, ačkoli byla naměřena vyhovující hodnota (falešně negativní výsledek).

Pro konfirmační stanovení musí chyba  $\beta$  dosahovat nejvýše hodnoty 0,05 (5%).

### **Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost (Within-laboratory reproducibility)**

Vnitrolaboratorní reprodukovatelností se rozumí přesnost dosažená v rámci téže laboratoře za předem stanovených podmínek (které se týkají např. metody, zkoušených materiálů, pracovníků a vnějších podmínek) během určitého odůvodněného časového intervalu.

### **Konfirmační metody**

Konfirmační metody jsou takové, které umožňují jednoznačnou identifikaci analytů v předpokládané koncentraci. Musí poskytovat co nejvíce jasných informací o chemické struktuře analytu. Jsou zaměřené na vyloučení falešně pozitivních výsledků. Metody založené pouze na chromatografické analýze bez použití spektrometrické detekce nejsou samy o sobě vhodné jako potvrzovací metody. Použití hmotnostní spektrometrie umožňuje detekci přítomnosti analytu, ale také jeho identifikaci na základě hmotnostního spektra.

Tyto metody jsou speciálně navrženy, aby přesně poskytovaly identifikaci nepovolených látek a látek se stanovenou hodnotou MRL. Jsou precizní a spolehlivé.

Podle směrnice 2002/657/EC musí konfirmační metoda použitelná pro konfirmaci vzorků, které jsou podezřelé z obsahu zakázaných látek, kombinovat separační techniku (např. GC) s technikou hmotnostní spektrometrie (MS).

## **2.8 Zvolená analytická metoda**

### **2.8.1 Metoda vnitřního standardu**

Při této metodě se ke vzorku přidává určité množství známé látky. Tato látka nesmí být přítomna v původním vzorku, musí být dobře oddělena od všech složek v původním vzorku a musí se eluovat v blízkosti stanovované složky. Vnitřní standard má být přednostně analyt značený stabilním izotopem, který je vhodný zejména pro detekci hmotnostním detektorem, nebo pokud to není možné, podobný standard, který má strukturu a retenční čas blízký retenčnímu času analytu.

Výhodou metody je, že není třeba znát přesný objem nástřiku vzorku. Umožňuje také eliminovat chyby [39].

## 2.8.2 Derivatizace

Derivatizací v chromatografických metodách se rozumí chemická přeměna molekul stanovované látky. Derivatizační reakce vedou k tvorbě detekovatelných derivátů, zvýšení citlivosti, těkavosti a selektivity, zvýšení rozlišení nebo umožnění separace vůbec. Účelem je odstranění aktivních vodíkových atomů, nejlépe v jediném reakčním kroku.

Derivatizaci můžeme rozdělit podle místa derivatizační reakce:

- předkolonová derivatizace (pre-column derivatization); chemická reakce probíhá před kolonou
- postkolonová derivatizace (post-column derivatization); chemická reakce probíhá za kolonou
- derivatizace na koloně (on-column); chemická reakce probíhá přímo v koloně

Všechny způsoby derivatizace mají vliv na eluční charakteristiky separovaných látek (účinnost separace a dobu analýzy) [15, 36].

## 2.8.3 Primární extrakce

### Extrelut NT 3

Extrakce lipofilních látek z komplexních matric je nezbytným krokem v rámci čištění vzorku před vlastní analýzou. Extrelut nahrazuje klasickou dělicí nálevku a činí extrakce jednoduššími a efektivnějšími. Hlavní jeho výhody jsou úspora času, materiálu a rozpouštědel.

Extrelut je tvořený speciálně zpracovanou, porézní křemelinou s velkým objemem pórů. Křemelina je chemicky inertní a může být použita v rozsahu pH od 1 do 13 [21].

### Proces čištění:

Kapalný vzorek se nanese na suchou kolonku naplněnou zrnitým Extrelutem. Rozšiřuje se přes chemicky inertní matici jako tenká vrstva a funkčně jako stacionární fáze. Eluce se provádí organickým rozpouštědlem, které je nemísitelné s vodou. Jakmile rozpouštědlo projde přes kolonu, všechny lipofilní sloučeniny jsou extrahovány z vodné fáze do fáze organické. Vodná fáze zůstává a v eluátu se netvoří interferující emulze. Láky rozpuštěné v eluátu jsou analyzovány hned nebo po odpaření rozpouštědla. Není potřeba vakuum. Vhodná rozpouštědla – diethyl ether, t-butylmethyl ether, ethyl acetát, methyl acetát, hexan, cyklohexan, chloroform, dichlormethan [21].

## 2.8.4 Extrakce tuhou fází (Solid phase extraction, SPE)

SPE je rychlá technika určená pro přípravu vzorků před chromatografickou analýzou. Je alternativou klasické organické extrakce. Její podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu.

Výhodou této techniky je tedy jednoduchý postup, úspora času při přípravě vzorků, nízká spotřeba rozpouštědel, vysoký výtěžek, dostupnost [19].

SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků s různou polaritou, pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění nežádoucích příměsí, rušících následná analytická stanovení [20].

## Příprava vzorků

Vzorek se musí převést do kapalné fáze. Tím je zaručena účinnost extrakce. Kapalně vzorky se před samotnou aplikací SPE přefiltrují. Tuhé vzorky musí být zhomogenizované, extrahované do rozpouštědla a přefiltrované či centrifugované. Vzorek ani rozpouštědlo nesmí kolonkou procházet příliš rychle. Jestliže obsahuje vzorek částice, na které by se mohly nasorbovat analyty, je nutné tyto částice nejprve odstranit - např. filtrací. Pokud jsou analyty ve vzorku vázané na velké molekuly, musí být tato vazba porušena, aby bylo dosaženo vysoké účinnosti extrakce [6, 22].

Důležitým krokem je výběr vhodného sorbentu.

Nejčastěji se používají tyto sorbenty:

- oktadecylsilanizovaný silikagel (C<sub>18</sub>-silikagel, silikagel s kovalentně navázaným řetězcem s osmnácti uhlíky)
- oktylsilanizovaný silikagel (C<sub>8</sub>- silikagel)
- trimethylsilanizovaný silikagel (C<sub>1</sub>- silikagel)
- kyanopropylsilanizovaný silikagel (CN- silikagel)
- aminopropylsilanizovaný silikagel (NH<sub>2</sub>-silikagel)
- nemodifikovaný silikagel

Největší využití z těchto uvedených silikagelů má C<sub>18</sub>- silikagel. Mimo to se ještě používají sorbenty na bázi oxidu hlinitého, celulózy, uhlíku a různých kopolymerů. Sorbent je uložen v trubičkách z polypropylenu nebo ze skla, a nebo slisován se skleněnými vlákny do disků [10, 19].

Princip SPE:

- kapalně vzorek je veden přes SPE kolonku a sloučeniny ze vzorku jsou zachyceny materiálem sorbentu v koloně
- nežádoucí příměsi mohou být z kolonky selektivně odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly
- nakonec mohou být z kolonky žádoucí analyty znovu získány elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu
- tento extrakt má často podstatně vyšší koncentraci analytu než měl původní vzorek [23, 45]

## 2.8.5 Plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC)

Plynová chromatografie je separační metoda, která k separaci par a plynu využívá dvě heterogenní fáze. Mobilní fází je inertní plyn. Stacionární fází je nejčastěji kapalina zakotvená na inertním nosiči, méně často povrchově aktivní adsorbent.

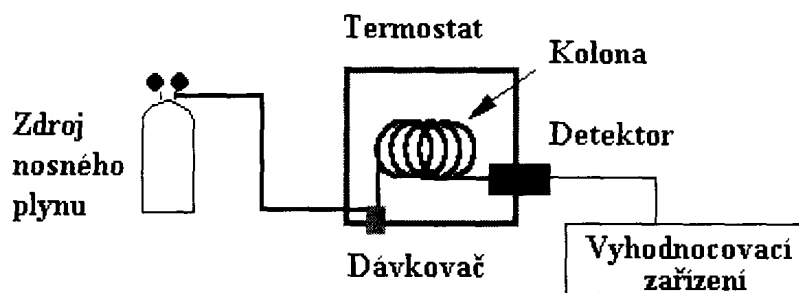
Jednotlivé složky vzorku jsou separovány na základě rozdílných interakcí se stacionární fází a jsou postupně eluovány inertním nosným plynem. Složky vycházející z kolony jsou postupně indikovány detektorem a signál odpovídající jejich obsahu, resp. koncentraci v nosném plynu, je samočinně registrován jako funkce času nebo objemu [37, 40].

Plynová chromatografie se používá pro analýzu:

- plyných vzorků – bez úpravy nebo po jejich zkoncentrování
- kapalných vzorků – bez úpravy, přímým nástřikem nebo nástřikem plynné fáze nad kapalinou nebo jejich převedením na těkavé sloučeniny chemickou reakcí
- tuhých vzorků – po jejich rozpuštění ve vhodném rozpouštědle, po jejich derivatizaci nebo kontrolovaném tepelném rozkladu (pyrolýza) [43]

#### **2.8.5.1 Instrumentace plynové chromatografie:**

- zdroj nosného plynu
- čistící zařízení
- zařízení na regulaci tlaku
- dávkovač
- chromatografická kolona
- termostat
- detektor
- vyhodnocovací zařízení



*Obr.1: Schéma plynového chromatografu*

#### **2.8.5.1 Zdroj nosného plynu**

Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev obsahující vodík, dusík, helium nebo argon. Nosný plyn unáší vzorek kolonou, sám neinteraguje se separovanými složkami a stacionární fází. Měl by se svým chováním blížit ideálnímu plynu, jeho volba závisí na druhu kolony a detektoru. Roli při jeho výběru hraje i potřeba netoxicity a bezpečnosti práce [37].

#### **2.8.5.2 Čistící zařízení**

Čistící zařízení zachycuje vlhkost a nečistoty v nosném plynu. Zbavuje nosný plyn nežádoucích stop ostatních plynů. Zejména odstraňuje stopy reaktivního kyslíku, který nevratně poškozuje stacionární fázi v koloně [37].

#### **2.8.5.3 Regulační systém**

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu [37].

#### 2.8.5.4 Dávkovač

Dávkovač slouží k zavedení analyzovaného vzorku na začátek chromatografické kolony, převedení vzorku do plynného stavu a vnesení vzorku do proudu nosného plynu. Dávkování musí být rychlé, vzorek se musí rychle odpařit. Množství dávkovaného vzorku musí vyhovovat daným parametrům použité kolony a v ideálním případě má vzorek zaujmout prostor odpovídající jednomu teoretickému patru. Dávkuje se pomocí plynotěsné stříkačky přes pryžové septum [36, 37].

Dávkování vzorku lze provádět těmito technikami:

- dávkování s děličem toku (split injection) – používá se u vzorků obsahujících velké množství složek, do kolony se dostává jen definovaný zlomek nastříkovaného množství, asi 0,1 – 2  $\mu\text{l}$
- dávkování bez děliče toku (splitless injection) – metoda je vhodná pro velké objemy (0,5 – 5  $\mu\text{l}$ ), používá se při analýze zředěných vzorků, aby se zabránilo rozšiřování zóny
- dávkování přímo do kapilární kolony (on column) – vzorek musí být rychle nastříknut a vytvořit kapalný film na stěně kolony. Dávkuje se 1 až 10  $\mu\text{l}$  [36]

#### 2.8.5.5 Chromatografická kolona

Kolona je část chromatografu, ve které je umístěna stacionární fáze. V koloně dochází k separaci složek. Existují dva druhy kolon:

- náplňové
- kapilární

*Náplňové kolony* jsou trubice naplněné sorbenty nebo nosiči pokrytými kapalnou fází. Jsou vyrobené z oceli, teflonu, hliníku, polyethylenu nebo ze skla. Vnitřní průměr kolony je 2 až 3 mm, délka 1 až 3 m. Mají vyšší kapacitu než kapilární kolony. Kolony se plní adsorbenty na bázi silikagelu, aktivního uhlí, aluminy či molekulových sít. Stacionární kapalina musí být zakotvena na nosiči, který umožní styk plynné a kapalné fáze. Jako nosiče se používá křemelina nebo modifikovaná křemelina. Upravují se tak, aby se neuplatňovaly jejich adsorpční vlastnosti.

*Kapilární kolony* využívají jako nosiče stacionární fáze své vnitřní stěny. Vyrábějí se obvykle z taveného křemene nebo kovů.

Kapilární kolony je možné rozdělit do tří skupin:

1. WCOT – kolony s kapalinou zakotvenou na vnitřní stěně kapiláry
2. SCOT – kolony s kapalinou zakotvenou na nosiči, který je zachycen na vnitřních stěnách kapiláry
3. PLOT – kolony s adsorbentem, který je zachycený na vnitřních stěnách kapiláry [37]

#### 2.8.5.6 Termostat

Termostat zajišťuje příslušně vysokou teplotu kolony, umožňující rozdělení složek vzorku. Pro plynovou chromatografii je velmi důležitá volba teplotního režimu. Při analýze jednodušší směsi látek je možno separovat za konstantní teploty. Složitější směsi jsou většinou analyzovány za podmínek teplotního gradientu, umožňujícího dosáhnout úplné

separace složek v kratším čase. Optimální teplota kolony závisí na bodu varu jednotlivých složek [40].

#### **2.8.5.7 Detektor**

Detektory jsou zařízení reagující na změny složení protékající mobilní fáze, které převádí na elektricky měřitelné veličiny. Detektor sleduje takovou vlastnost plynu z kolony, která závisí na druhu a koncentraci složek. Musí mít dostatečnou citlivost a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu analytu. Důležitá je i vysoká selektivita pro stanovované analyty [36, 40].

Ideální detektor pro plynovou chromatografii by měl mít:

- vysokou citlivost
- nízký šum
- dobrou stabilitu a reprodukovatelnost
- rychlou odezvu, nezávislou na toku mobilní fáze
- lineární dynamickou odezvu v rozsahu několika řádů
- obdobnou odezvu pro všechny analyty, nebo selektivní odezvu pro jednu nebo více skupin analytů

Podle dějů, které probíhají při detekci, lze detektory rozdělit na:

- destrukční – látka se při detekci ireverzibilně změní (FID, TID, MSD)
- nedestrukční – látka prochází detektorem bez toho, aby se chemicky změnila (TCD, ECD)

Podle povahy závislosti signálu, lze detektory rozdělit na:

- koncentrační – reagují na okamžitou koncentraci složky v eluátu
- hmotnostní – reagují na celkové množství detekované složky v čidle

Podle způsobu vyhodnocení lze detektory rozdělit na:

- integrální – reagují na celkové množství separovaných látek od začátku měření do jeho ukončení
- diferenciální – signál je úměrný okamžité koncentraci látky v prostoru detektoru

Další dělení detektorů:

- univerzální – použitelné k detekci širokého spektra sloučenin
- selektivní – umožňují detekci sloučenin specifických vlastností

#### ***Tepelně vodivostní detektor (TCD)***

Principem detekce je odvod tepla z rozžhaveného odporového vlákna plynem vytékajícím z kolony. Změnou teploty vlákna se mění elektrický odpor. Pro použití je důležitá volba nosného plynu [37].

#### ***Ionizační detektory***

Jsou to nejpoužívanější detektory. Jejich funkce je založena na měření elektrické vodivosti v plynech.



#### **a. Plamenový ionizační detektor (FID)**

Chromatografická kolona ústí do trysky, kam se přivádí i vodík. Okolo trysky zespodu proudí vzduch. Na špičce trysky hoří vodíko-kyslíkový plamínek, ve kterém se spálí všechny organické látky vystupující z chromatografické kolony. Jejich hořením vznikají ionty. Do okolí plamínku se umístí dvě elektrody, na které se přivede napětí. Pohybem iontů mezi elektrodami vzniká měřitelný proud [36].

#### **b. Termoionizační detektor (TID,AFID)**

Tento detektor je selektivní pro látky obsahující heteroatomy (N,P,S). V efektivním prostoru detektoru je přítomen alkalický kov (Cs). Koncentrace analyzovaných látek je úměrná proudu, který prochází mezi polarizovanými elektrodami [37].

#### **c. Detektor elektronového záchytu (ECD)**

Principem je zachycování elektronů. Výstup z kolony je vedený mezi dvě elektrody. Jedna z těchto elektrod je pokrytá aktivním  $\beta$ -zářičem. Z katody vylétávají elektrony, anoda je zachycuje. Mezi elektrodami teče stabilní proud. Jestliže z kolony vystupují látky, které mají k elektronům vysokou afinitu, tak je část vyzářených elektronů zachycena. Proud mezi elektrodami se sníží úměrně tomu, kolik látek vstoupilo do detektoru. Tento detektor je tedy nedestruktivní a jako jediný registruje pokles základního proudu [37].

#### **d. Fotoionizační detektor (PID)**

Ionizaci látek způsobuje ultrafialové záření. Vhodnou volbou vlnové délky ultrafialového záření se významně ovlivní selektivita detektoru [37].

### **2.8.5.8 Vyhodnocovací zařízení**

V současné době se k vyhodnocování analýzy používá počítač, který pracuje automaticky. Zpracovává signál z detektoru, zakresluje chromatografickou křivku a vyhodnocuje ji. Z chromatogramu se tak mohou získat informace pro kvalitativní i kvantitativní stanovení [37].

### **2.8.6 Hmotnostní spektrometrie (Mass spectrometry, MS)**

Hmotnostní spektrometrie je fyzikálně chemická metoda určování hmotností atomů, molekul a jejich částí po jejich převedení na kladné nebo záporné ionty. Je to moderní analytická metoda založená na interakci iontů s elektrickým a magnetickým polem. Umožňuje rychlou analýzu obsahu hlavních i stopových prvků s velmi nízkými mezemi stanovitelnosti. Dává informace o struktuře analyzovaných látek.

Při hmotnostní spektrometrii se z neutrálních molekul nebo prvků v iontovém zdroji vytváří ionty, které se při přebytku vnitřní energie získané při ionizaci dále štěpí na fragmentové ionty, radikály a neutrální částice. Nabité částice jsou pak separovány v analyzátoru podle poměru hmotnosti k náboji a nakonec se zaznamenávají v detektoru. Částice bez náboje nejsou zpracovávány ani registrovány, protože nepodléhají působení elektrického a magnetického pole [38].

Vzorek je obvykle nutné nejprve převést do roztoku. Roztok je v plynném prostředí za velmi vysoké teploty atomizován. Současně dojde k ionizaci atomů. Vzniklé ionty jsou urychleny průchodem mezi urychlovacími elektrodami. Svazek rychle letících iontů vstoupí do evakuované trubice se silným magnetickým nebo vysokofrekvenčním elektrickým polem, v němž dojde k roztržení iontů podle poměru hmotnost/náboj (lehčí iont s vyšším nábojem je vychylován více než těžší iont s nižším nábojem). Při vhodném nastavení přístroje je možno postupně detekovat různé ionty. Výsledkem je tzv. hmotnostní spektrum, které umožňuje velmi přesně určit složení vzorku [41].

Hmotnostní spektrometr ve spojení se separační technikou může pracovat ve dvou základních modech:

**SCAN**- během analýzy jsou opětovně registrována spektra v nastaveném hmotnostním rozsahu.

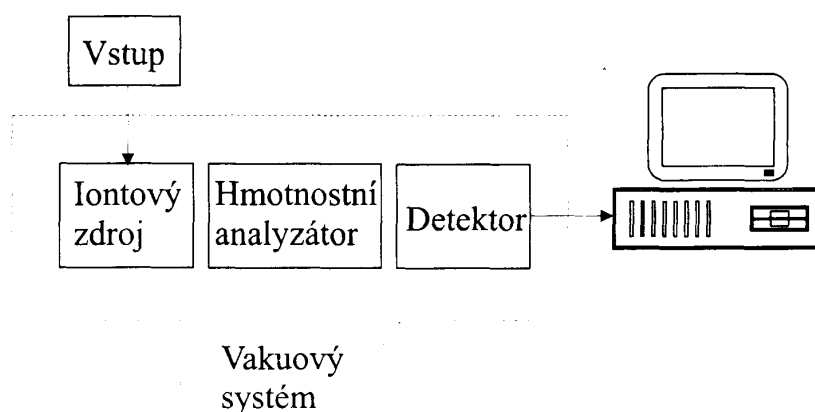
Dle 2002/657/EC: Provádí-li se při hmotnostní spektrometrii snímání celého spektra, vyhodnotí se všechny ionty s relativní výškou více než 10 % v největší intenzitě [31].

**SIM** – (Selected Ion Monitoring) – sledování diagnostických iontů vhodně vybraných tak, aby charakterizovaly analyt, který chceme analyzovat.

Dle 2002/657/EC: Provádí-li se hmotnostně spektrometrické stanovení fragmentografií, musí se sledovat minimálně čtyři ionty a stanovovat jejich poměry. Poměr signál-šum musí být pro každý diagnostický iont 3:1 [31].

#### ***Instrumentace hmotnostní spektrometrie:***

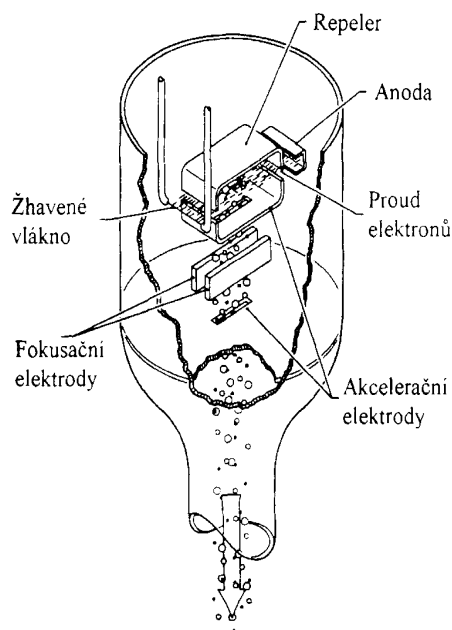
- iontový zdroj
- hmotnostní analyzátor
- detektor
- datasystém hmotnostních spektrometrů
- vakuový systém



*Obr. 2: Schéma hmotnostního spektrometru*

### 2.8.6.1 Iontový zdroj

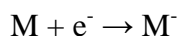
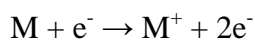
Iontový zdroj převádí analyzované látky do ionizovaného stavu. Úspěšná ionizace je důležitým prvkem pro úspěch celé analýzy [41].



Obr. 3: Iontový zdroj

#### *Ionizace nárazem elektronů (Electron Impact, EI)*

Ionizace nárazem elektronů je příkladem tvrdé ionizační techniky (tj. dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu) z plynné fáze. Jedná se v současnosti o nejběžnější a nejlépe propracovaný způsob ionizace. Energetickým procesem vedoucím k tvorbě iontů je interakce analyzované látky s proudem urychlených elektronů. Děje, ke kterým při této interakci může dojít jsou :



Jako zdroj elektronů se nejčastěji používá elektricky žhavené rheniové nebo wolframové vlákno. Velikost žhavicího proudu určuje množství emitovaných elektronů. Proud elektronů je směřován prostorem iontového zdroje směrem k anodě. Potenciálový rozdíl mezi žhaveným vláknem a anodou určuje energii elektronů přicházejících do kontaktu s ionizovanou látkou. Jako standardní je považována energie 70eV, která ve většině případů zajišťuje vznik maximálního počtu iontů a jejich rozsáhlou fragmentaci. Pro zvýšení pravděpodobnosti interakce s molekulou je někdy dráha elektronů zakřivována polem malého permanentního magnetu umístěného v prostoru ionizační komůrky. Vzniklé ionty jsou z prostoru ionizační komůrky vytlačovány elektrostatickým polem pomocné elektrody udržované na vhodném potenciálu. Proud iontů je dále urychlen a směřován z iontového zdroje soustavou akceleračních a fokusačních elektrod [41].

### *Chemická ionizace (Chemical ionization, CI)*

Je příkladem běžně používané měkké ionizační techniky (tj. energetický přebytek dodaný ionizované molekule je malý a pravděpodobnost fragmentace nízká) z plynné fáze. Primárním zdrojem je proud urychlených elektronů. Jejich energie však není přenášena na analyzovanou molekulu přímo, ale zprostředkovaně přes tzv. reakční medium. V ionizační komůrce je pod relativně velkým tlakem (50-150 Pa) přítomno reakční médium. Jedná se nejčastěji o plyn, nebo páry nízkovroucí kapaliny. Vyšší tlak v iontovém zdroji výrazně zvyšuje pravděpodobnost mezimolekulárních a meziiontových interakcí. Výběr reakčního plynu ovlivňuje množství předané energie v procesu chemické ionizace a tím i rozsah možných fragmentací [41].

#### **2.8.6.2 Hmotnostní analyzátor**

Analyzátor umožňuje rozdělit v prostoru nebo v čase směs iontů o různých hmotnostech produkovaných v iontovém zdroji. Důležitým parametrem analyzátorů je jejich rozlišovací schopnost. Nejčastěji využívaný hmotnostní analyzátor je *kvadrupolový hmotnostní filtr*, tvořený čtyřmi tyčemi přičemž dvě protilehlé jsou vždy elektricky propojeny. Na dvojici tyčí se vkládá elektrické napětí. *Iontová past* je tvořena 3 elektrodami. Vlivem střídavého elektrického pole vytvářeného radiofrekvenčním napětím vkládaným na prstencovou elektrodu lze v pasti zachytit ionty a pak je postupným zvyšováním amplitudy napětí na prstencové elektrodě a s pomocí dalších napětí vkládaných na krycí elektrody sekvenčně vypudit na detektor. *Analyzátor doby letu* (Time-of-flight) je tvořený iontovou celou, ze které se ionty vystřelují na reflektoru, který je zbrzdí, otočí a oni letí trubici zpátky. Ionty jsou urychleny na stejnou kinetickou energii, ale mají rozdílnou rychlost, z důvodu odlišné hmotnosti. K časovému rozdělení iontů s rozdílným  $m/z$  dochází na základě jejich odlišné doby letu z iontového zdroje do detektoru [38].

#### **2.8.6.3 Detektor**

Detektor slouží k detekci iontů po jejich separaci podle  $m/z$  a k určení relativní intenzity jednotlivých iontů [38].

#### **2.8.6.4 Datasystém hmotnostních spektrometrů**

Datasystém je tvořen výkonným osobním počítačem s příslušným programovým vybavením pro ovládání a kontrolu všech funkcí systému a pro sběr a zpracování naměřených dat. Tento systém většinou pracuje pod operačním systémem MS-Windows [38].

#### **2.8.6.5 Vakuový systém**

Vakuový systém zajišťuje udržení dostatečného vakua v systému, protože je nutné, aby nedošlo ke srážce iontu s jinou částicí během celé jeho cesty hmotnostním spektrometrem. Nejčastěji bývá dvoustupňový. První stupeň tvoří standardní rotační olejová vývěva, druhý difúzní nebo turbomolekulární čerpadlo [41].

### **2.8.7 Plynová chromatografie – hmotnostní spektrometrie (Gas chromatography-Mass spectrometry; GC-MS)**

Hmotnostní spektrometrie je nejužívanější spektrometrickou technikou pro identifikaci organických sloučenin, obvykle vyžaduje minimální množství vzorku. Často bývá ve spojení s moderními separačními metodami – plynovou nebo kapalinovou chromatografií.

Na GC dochází obvyklým způsobem k rozdělení směsi na komponenty, které postupně vycházejí z kolony společně s nosným plynem. Kapilární kolona je zavedena do evakuovaného prostoru MS, do iontového zdroje. GC-MS se používá ve spojení s elektronovou ionizací nebo s chemickou ionizací. Obvyklé tlaky v prostoru analyzátoru jsou v řádu  $10^{-5}$  Torr.

Spojení mezi chromatografem a detektorem zajišťuje interface termostatovaný na vysokou teplotu.

Při analýze vzorků pomocí GC-MS můžeme získat dva druhy záznamů – chromatogram, který dává informace o počtu složek přítomných ve vzorku – a hmotnostní spektra jednotlivých píků, ze kterých se usuzuje na kvalitu složek, popř. možnost prokázání současné eluce více složek v jediném píku [42].

## 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1 Laboratorní vybavení

#### 3.1.1 Standardy a vnitřní standardy

- $\alpha$ -testosteron, RIVM
- $\beta$ -testosteron, RIVM
- $\beta$ -testosteron-d<sub>2</sub>, RIVM
- $\alpha$ -nortestosteron, RIVM
- $\beta$ -nortestosteron, RIVM
- $\beta$ -nortestosteron-d<sub>3</sub>, RIVM
- $\beta$ -boldenon, RIVM
- $\beta$ -boldenon-d<sub>3</sub>, RIVM
- methyltestosteron, RIVM
- methyltestosteron-d<sub>3</sub>, RIVM
- methylboldenon, Fluka
- methylboldenon-d<sub>3</sub>, RIVM
- norclostebol, RIVM
- chlortestosteron-d<sub>3</sub>, RIVM

#### 3.1.2 Chemikálie

- methanol, Merck, cat.no. 1.06011
- ethylacetát, Merck, cat.no. 1.10972
- tercbutylmetylether (BME), Merck, cat.no. 1.01995
- n-hexan, Merck, cat.no. 1.04371
- toluen, Merck, cat.no. 1.08389
- etanol, Merck, cat.no. 1.11727
- toluen/hexan 1/9 (v/v)
- toluen/hexan 5/9 (v/v)
- toluen/etanol 99/1 (v/v)
- aceton, Merck, cat.no. 1.00012 (sušený molekulovým sítem)
- kyselina chlorovodíková (HCl) 1mol/l vodný roztok
- anhydrid kyseliny heptafluoromáselné (HFBA), Fluka, cat.no. 77251
- bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) s 1% TMCS Sigma cat.no. T6381
- $\beta$ -glukuronidasa Merck, cat.no. 1.04114
- deionizovaná voda

#### 3.1.3 Plyny

- helium 6.0. LindeTechnoplyn v tlakové láhvi s redukčním ventilem
- dusík 5.0. Linde

### 3.1.4 Přístroje

- plynový chromatograf Agilent Technologies 6890 s on-column injektorem (systém duck bill) s hmotnostním detektorem 5973N
- chromatografická křemenná kapilární kolona Agilent Technologies HP-1MS cat. no. 19091S-933, délka 30m, I. D. 0.25 mm, film 0.25  $\mu$ m
- počítač PC, Intel Pentium Processor, software Agilent Technologies, rev. D
- analytické váhy Sartorius Genius
- ultrazvuková lázeň Ultrasonic Tesla UC 005 AJ1
- rotační vakuový odpařovák Heidolph VV Micro
- koncentrátor Termovap TV-10
- předvážky OHAUS
- pH metr Mettler MI229KI s ISFET elektrodou
- vakuové zařízení Visiprep Supelco pro SPE kolony

### 3.1.5 Pracovní pomůcky

- derivatizační vialky 1 ml, septum silikon/teflon nebo septum neopren/teflon
- skleněná kolona pro aluminu se skleněnou fritou a PTFE výtokovým ventilem, I.D. 10 mm, délka asi 200 mm
- alumina neutral, activity grade I Sigma cat.no. A-9003
- kolony Extrelut NT 3, Merck, cat.no. 1.15095
- mikrostříkačky
- odměrné baňky, odměrné válce, kádinky
- špachtle, lžíce, tyčinky
- SPE kolonka - SUPELLEAN LC – alumina N, SUPELCO, cat.no.57087

## 3.2 Roztoky standardů

K této práci byly použity následující standardy a vnitřní standardy:

*$\alpha$ -testosteron*

Zásobní roztok: 10  $\mu$ g/ml v ethanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu$ g/ml v methanolu

*$\beta$ -testosteron*

Zásobní roztok: 1 mg/ml v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu$ g/ml v methanolu

*$\beta$ -testosteron- $d_2$*

Zásobní roztok: 10  $\mu$ g/ml v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu$ g/ml v methanolu

*$\alpha$ -nortestosteron*

Zásobní roztok: 0,1 mg/ml v ethanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu$ g/ml v methanolu

*$\beta$ -nortestosteron*

Zásobní roztok: 1mg/ml v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu$ g/ml v metanolu

*$\beta$ -nortestosteron- $d_3$*

Zásobní roztok: 10  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

*17 $\beta$ -boldenon*

Zásobní roztok: 1  $\text{mg/ml}$  v ethanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

*$\beta$ -boldenon- $d_3$*

Zásobní roztok: 10  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

*methyltestosteron*

Zásobní roztok: 1  $\text{mg/ml}$  v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v metanolu

*methyltestosteron- $d_3$*

Zásobní roztok: 1  $\text{mg/ml}$  v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

*methylboldenon*

Zásobní roztok: 1  $\text{mg/ml}$  v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

*methylboldenon- $d_3$*

Zásobní roztok: 10  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

*norclostebol*

Zásobní roztok: 1  $\text{mg/ml}$  v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

*chlortestosteron- $d_3$*

Zásobní roztok: 10  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

Pracovní roztok: 3  $\mu\text{g/ml}$  v methanolu

### **3.3 Použitá analytická metoda**

Účelem práce bylo vyvinout metodu vhodnou pro stanovení nízkých koncentrací uvedených steroidů v moči hospodářských zvířat. Tzv. „multi metoda“ umožňuje stanovení více druhů analytů v jednom vzorku současně [16].

#### **3.3.1 Kalibrace**

Kalibrační řada byla připravena v rozsahu 0 až 10  $\text{ng/ml}$  (0, 1, 2, 5 a 10  $\text{ng/ml}$ ), tzn. 0 až 30  $\text{ng/vzorek}$  (0, 3, 6, 15 a 30  $\text{ng/vz}$ ) přidáním standardů steroidních analytů do vzorku moči, který tyto analyty neobsahuje. Nadávkovalo se 0, 1, 2, 5 a 10  $\mu\text{l}$  pracovního roztoku do 3  $\text{ml}$  vzorku.

#### **3.3.2 Deaktivace aluminy**

Do zábrusové baňky bylo naváženo 10  $\text{g}$   $\text{Al}_2\text{O}_3$  aktivity 0. K naváženému sorbentu bylo přidáno 0,6  $\text{ml}$  vody. Baňka se uzavřela skleněnou zátkou a otáčela tak, aby se dosáhlo



rovnoměrného rozložení vlhkosti v alumině. Baňka se nechala přes noc stát při laboratorní teplotě. Sorbent byl tak deaktivován přesně na aktivitu 3.

### 3.3.3 Dekonjugace $\beta$ -glukuronidasou

Ze vzorku moči se odebrala část o objemu 3 ml, k ní se přidalo 6  $\mu$ l pracovního roztoku příslušných vnitřních standardů. Výsledná koncentrace vnitřních standardů byla 2 ng/ml, tj. 6 ng/vzorek. pH vzorku se upravilo 1 mol/l kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu 5,2. K takto připravenému vzorku se přidalo 30  $\mu$ l roztoku  $\beta$ -glukuronidasy a vzorek se nechal přes noc stát při laboratorní teplotě.

### 3.3.4 Příprava primárního extraktu na koloně

Vzorek se nanese na kolonu Extrelut NT 3 a nechal se stát 10 minut. Poté se kolona promyla 2 ml ethylacetátu a opět se nechala stát. Za dalších 5 minut se analyt vymyl 15 ml ethylacetátu do odpařovací baňky. Extrakt se odpařil do sucha na rotačním odpařováku.

### 3.3.5 Čištění extraktu na koloně

Z připravené aluminy se do kádinky odváží 2 g. Alumina se ihned zalila toluenem a převedla do skleněné kolony s fritou. Kolona se promyla 10 ml roztoku toluen/hexan 1/9 (v/v). Vzorek se připravil rozpuštěním odparku ve 100  $\mu$ l BME a 3 ml roztoku toluen/hexan 5/9 (v/v) za pomoci ultrazvuku. Vzorek se nanese na kolonu. Zkumavka se poté vymyla 2 ml roztoku toluen/hexan 5/9 (v/v), které se znovu nanese na kolonu. Kolona se promyla dalšími 5 ml tohoto roztoku, dále 10 ml toluenu a 5 ml roztoku toluen/etanol 99/1 (v/v). Analyt se nakonec vymyl 15 ml roztoku toluen/etanol 99/1 do odpařovací baňky. Eluát se odpařil na vakuovém rotačním odpařováku dosucha. Odparek se převedl 2 krát 0,5 ml BME do vialky a vysušil proudem dusíku [46].

### 3.3.6 Derivatizace pomocí aceton / HFBA

K odparku se mikrostříkačkou přidalo 40  $\mu$ l sušeného acetonu a 10  $\mu$ l HFBA, odparek se rozpustil a směs se inkubovala 30 minut při 75 °C. Po ochlazení se přebytek činidla odpařil v proudě dusíku. Suchý zbytek se rozpustil v 50  $\mu$ l toluenu [16].

## 3.4 Analýza steroidů

Z takto připraveného vzorku byl odebrán 1  $\mu$ l a nadávkován do plynového chromatografu. Podmínky GC analýzy:

- plynový chromatograf Agilent Technologies 6890
- nosný plyn: He, průtok 1,2 ml/min
- dávkování: 1  $\mu$ l; metoda manual cool on column injection
- teplotní program:  $T_{poč}$  80 °C, 0 min.,  $\beta_1$  30 °C/min. do 220 °C,  $\beta_2$  5 °C/min. do 280 °C, 2 minuty 280 °C
- teplota injektoru při nástřiku: 83 °C

- kolona: kapilární Agilent Technologies HP-1MS, o rozměrech 30 m x 0,25 mm tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 μm

#### Detekce:

Hmotnostní detektor v modu EI, teplota iontového zdroje 230 °C, teplota kvadrupólu 150 °C, SIM mode.

**Tabulka č. 3:** Přehled sledovaných iontů

Sledované ionty	Pro identifikaci	Pro kvantifikaci	Pro ISTD
<b>17α-testosteron</b>	451, 467, 665, 680	680	682
<b>17β-testosteron</b>	451, 467, 665, 680	680	682
<b>17α-nortestosteron</b>	306, 453, 666, 667	666	669
<b>17β-nortestosteron</b>	306, 453, 666, 667	666	669
<b>17β-boldenon</b>	343, 369, 464, 678	678	681
<b>methylboldenon</b>	367, 435, 463, 478	478	481
<b>methyltestosteron</b>	355, 369, 465, 480	480	483
<b>norclotestebol</b>	255, 290, 292, 427	427	-
<b>chlortestosteron-d<sub>3</sub></b>	-	-	485

### 3.5 Statistické zpracování dat

#### Linearita

Dříve popsaným postupem byly získány vzorky o různých koncentracích, které byly analyzovány plynovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií. Ze získaných ploch píků byly sestaveny kalibrační přímky, ze kterých byla stanovena linearita.

Linearita je chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. analytickým signálem a koncentrací analytu. Je vyjádřena korelačním a regresními koeficienty.

$$y = a + bx \quad (1)$$

kde parametr  $a$ .....je úsek posunutí

parametr  $b$ .....je směrnice kalibrační přímky [44]

#### Opakovatelnost měření

##### Aritmetický průměr

Při opakování analýzy ( $n \rightarrow \infty$ ) získáme soubor rozdílných hodnot  $x_i$ , které mají často normální (Gaussovo) pravděpodobnostní rozdělení. Očekávaná hodnota  $\bar{x}$ , která v případě normálního rozdělení současně představuje nejčtenější hodnotu, se nejčastěji odhaduje jako aritmetický průměr [28].

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i \quad (2)$$

### *Směrodatná odchylka*

Rozptýlení jednotlivých hodnot  $x_i$  okolo průměru  $\bar{x}$  je zpravidla charakterizováno hodnotou směrodatné odchylky. Směrodatná odchylka je tedy mírou přesnosti výsledků stanovení [28].

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (3)$$

### *Relativní směrodatná odchylka*

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální rozptyl od střední hodnoty.

$$s_r = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (4)$$

### **Konfirmace**

Pro potvrzení látek uvedených ve skupině A v příloze I směrnice 96/23/ES se požadují nejméně čtyři identifikační body. Každý iont může být počítán pouze jednou [31].

### **Limit rozhodnutí**

$$CC\alpha = 2,44 \cdot Sb_w / m_w \quad (5)$$

kde parametr  $Sb_w$ .....standardní odchylka hodnoty  $b_w$  vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti  
 $m_w$ .....směrnice křivky závislosti relativní odezvy na koncentraci při měření  
vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti

### **Detekční schopnost**

$$CC\beta = CC\alpha + (1,64 \cdot Sb_w / m_w) \quad (6)$$

## 4 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato práce se zabývala vývojem vhodné metody pro současné stanovení většího počtu steroidních látek ve vzorcích moči.

Bylo nutné vyvinout metodu tak, aby splňovala kritéria uvedená v Rozhodnutí Komise 2002/657/EC pro konfirmační metody používané pro stanovení látek uvedených ve skupině A, příloze směrnice 96/23/EC.

Pro identifikaci a kvantifikaci byly proto použity moderní analytické metody - a to spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. K tomu, aby byly výsledky přesné a jednoznačné, bylo nutné, aby byly splněny optimální kvantitativní a kvalitativní podmínky analýzy: dobré rozlišení, ostré a symetrické píky, vysoká přesnost, opakovatelnost a správnost naměřených ploch píků.

Multi-reziduální metoda je vhodná pro stanovení osmi analytů pomocí šesti vnitřních standardů. Celý postup zahrnuje přípravu extraktu na koloně Extrelut, přečištění na koloně aluminy, derivatizaci, GC separaci a detekci MS. Identifikace analytů ve vzorku byla provedena srovnáním retenčních časů a hmotnostních spekter s analyty měřenými samostatně. Konfirmace byla provedena podle požadavků CD 2002/657/EC.

### 4.1 Výběr vhodného derivatizačního činidla

Účelem derivatizace u GC je zlepšení chromatografických vlastností analyzovaných látek. Častým derivatizačním postupem je silylace – převedení na trimethylsilylderiváty. Pro tento účel bylo použito činidlo BSTFA. Výsledky nebyly dobré, protože píky nebyly dostatečně oddělené, symetrické a byly rušeny procházejícími nečistotami.

Lepším činidlem se nakonec ukázalo druhé vybrané činidlo – HFBA (vznikaly deriváty heptafluoromáselné kyseliny). Chromatografované produkty po derivatizaci poskytovaly při detekci ionty s vyšší hmotností, které byly méně rušeny zbytky nečistot z matrice.

### 4.2 Výběr vhodné kolonky

Nejdříve byla metoda provedena s komerční kolonkou SUPELLEAN LC – alumina N. Tato kolonka se nakonec ukázala jako nevhodná. Důvodem byla její nízká aktivita, která neodpovídala deklarované hodnotě. Patrně při skladování se do kolonky dostala vlhkost ze vzduchu, která pokles aktivity způsobila.

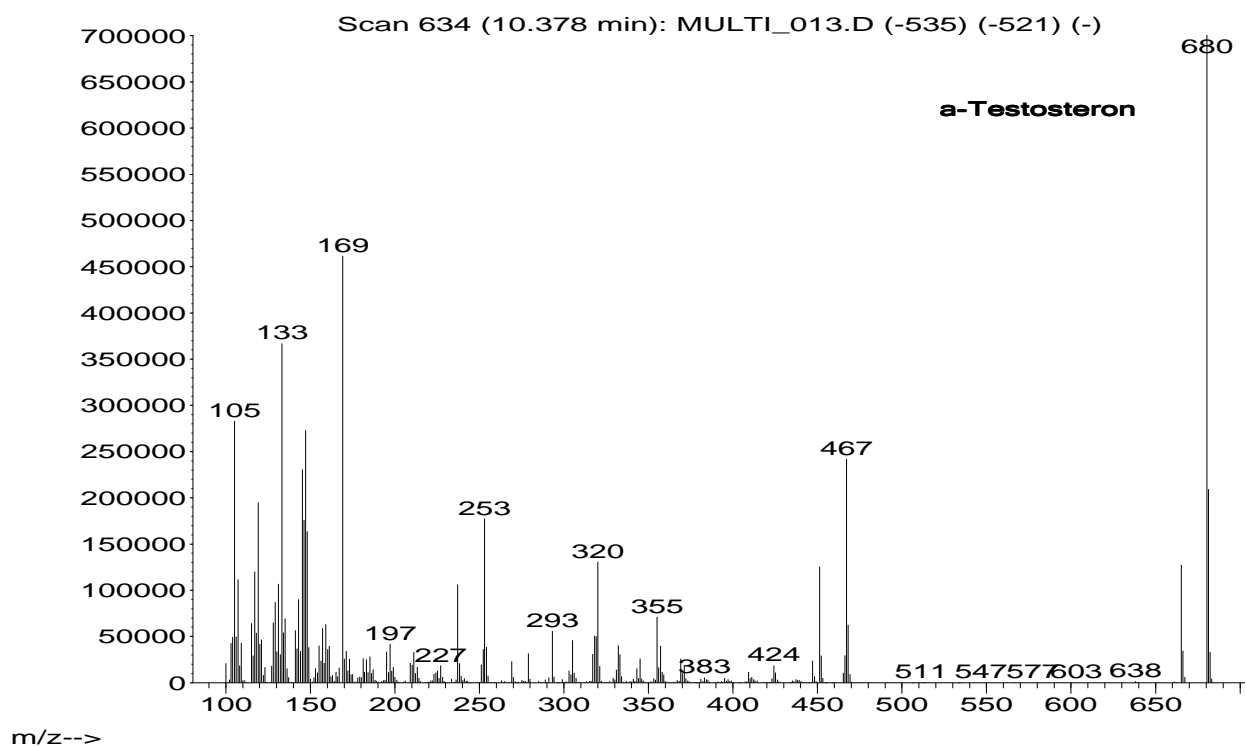
Následně byly použity kolonky s aluminou, deaktivované na aktivitu 3, které byly plněné bezprostředně před použitím. Kolonky dostatečně zachycovaly veškeré nečistoty pocházející z matrice, bez významných ztrát analytů.

### 4.3 Identifikace jednotlivých steroidů

Derivát byl identifikován vždy pomocí retenčního času a hmotnostního spektra.

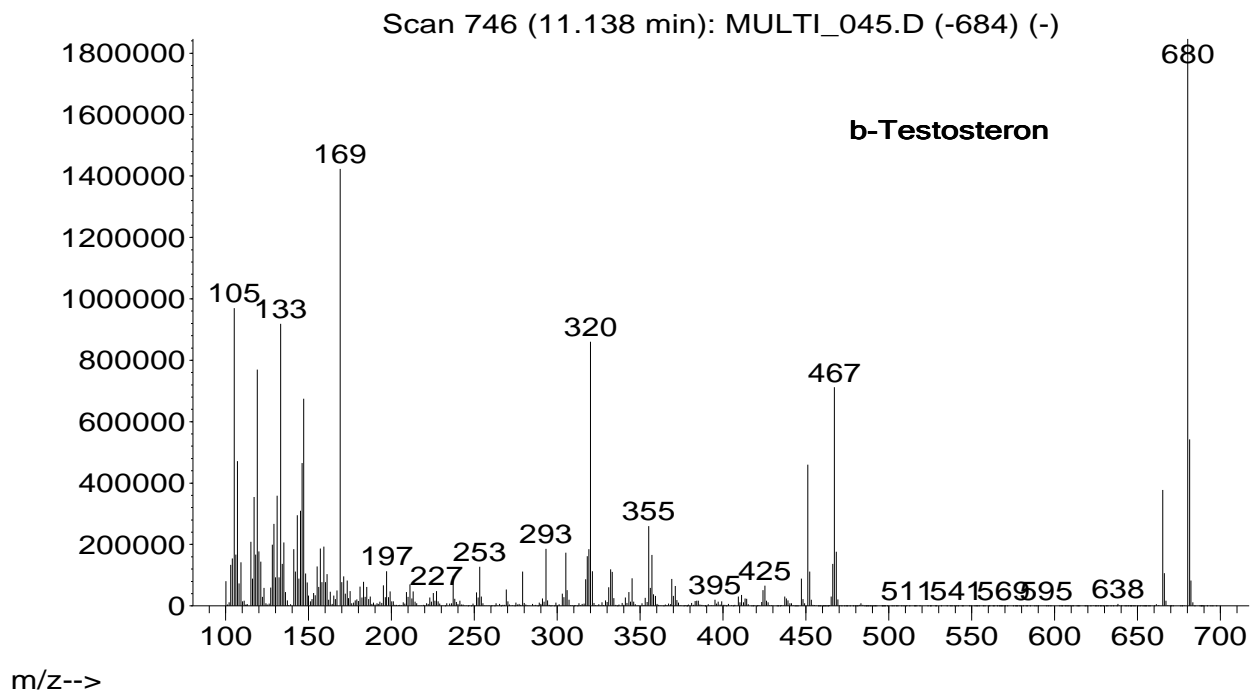
Grafy 1 – 8 znázorňují spektra jednotlivých steroidních analytů.

Abundance



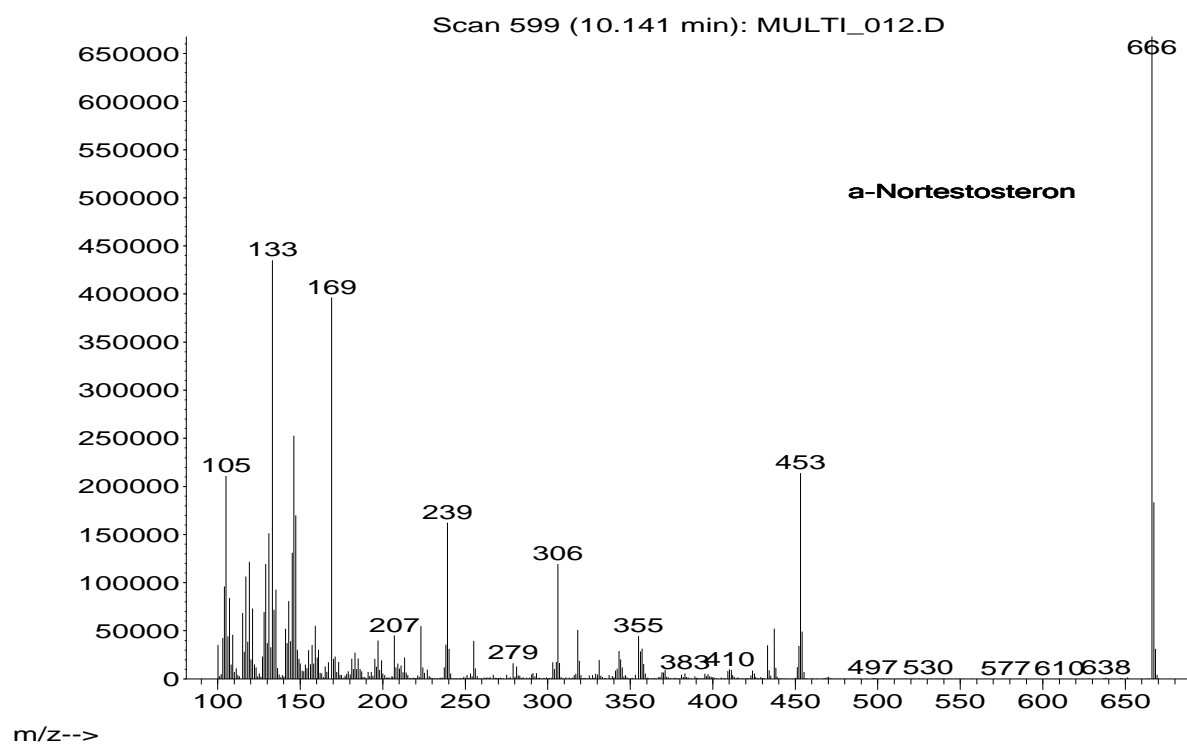
Graf 1: Spektrum  $\alpha$ -testosteronu (HFBA derivát)

Abundance



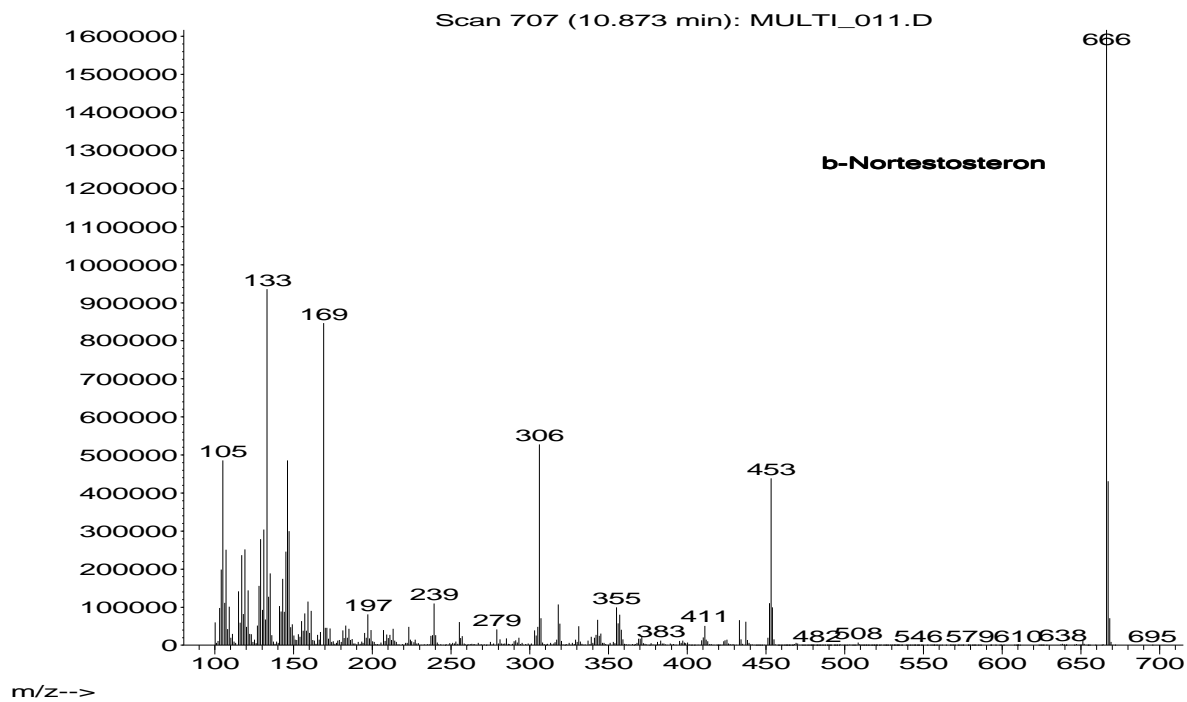
Graf 2: Spektrum  $\beta$ -testosteronu (HFBA derivát)

Abundance



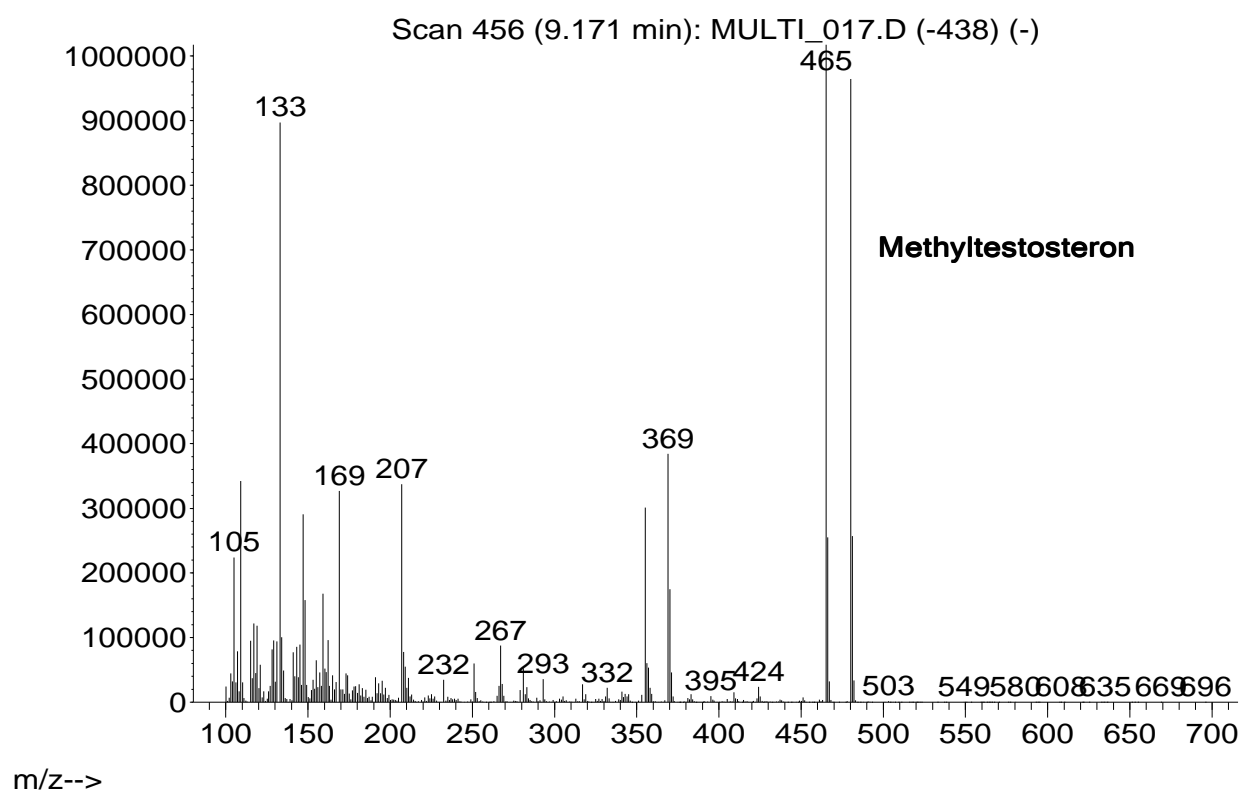
Graf 3: Spektrum  $\alpha$ -nortestosteronu (HFBA derivát)

Abundance



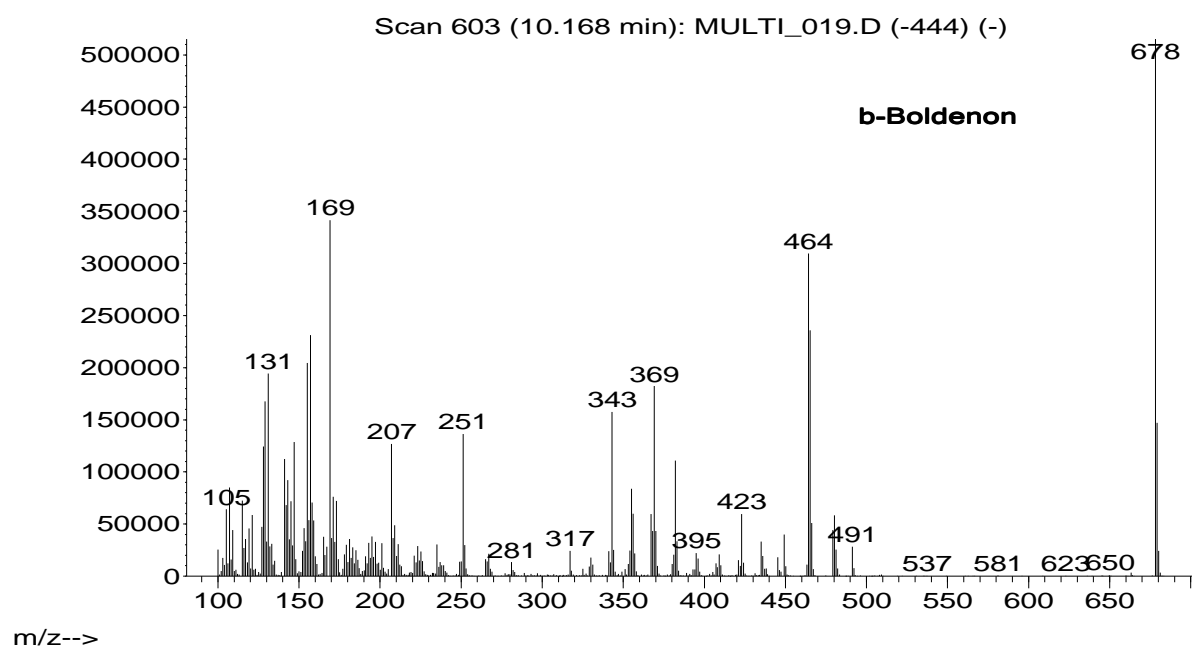
Graf 4: Spektrum  $\beta$ -nortestosteronu (HFBA derivát)

Abundance



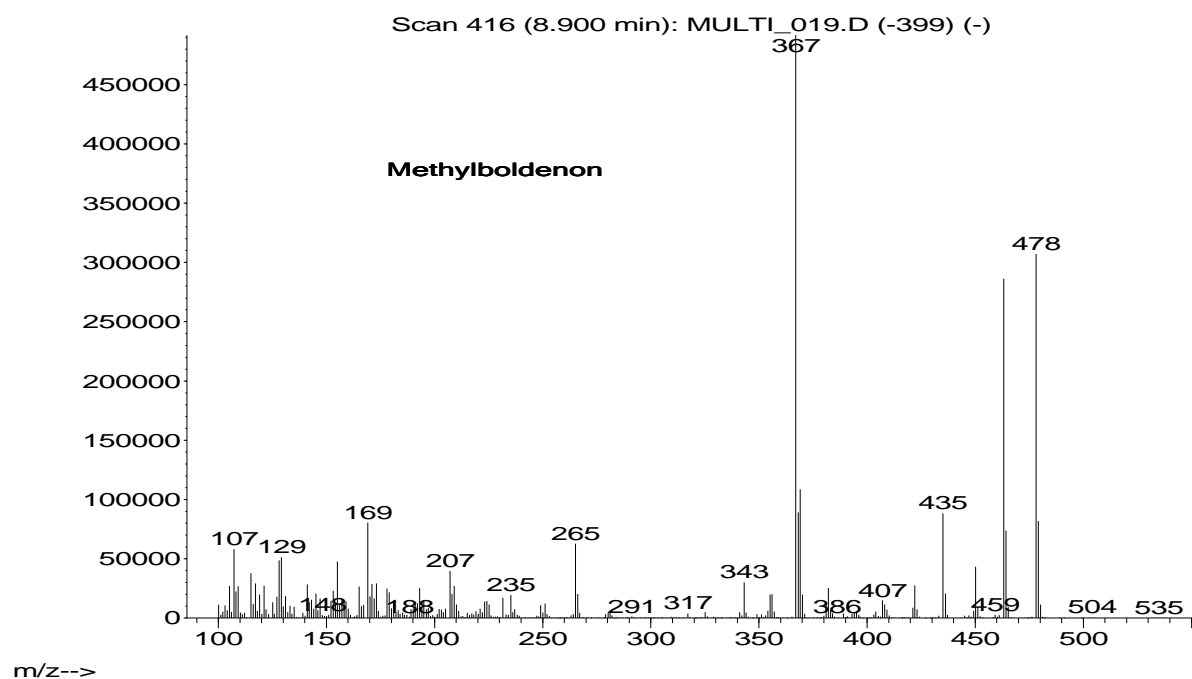
Graf 5: Spektrum methylestosteronu (HFBA derivát)

Abundance



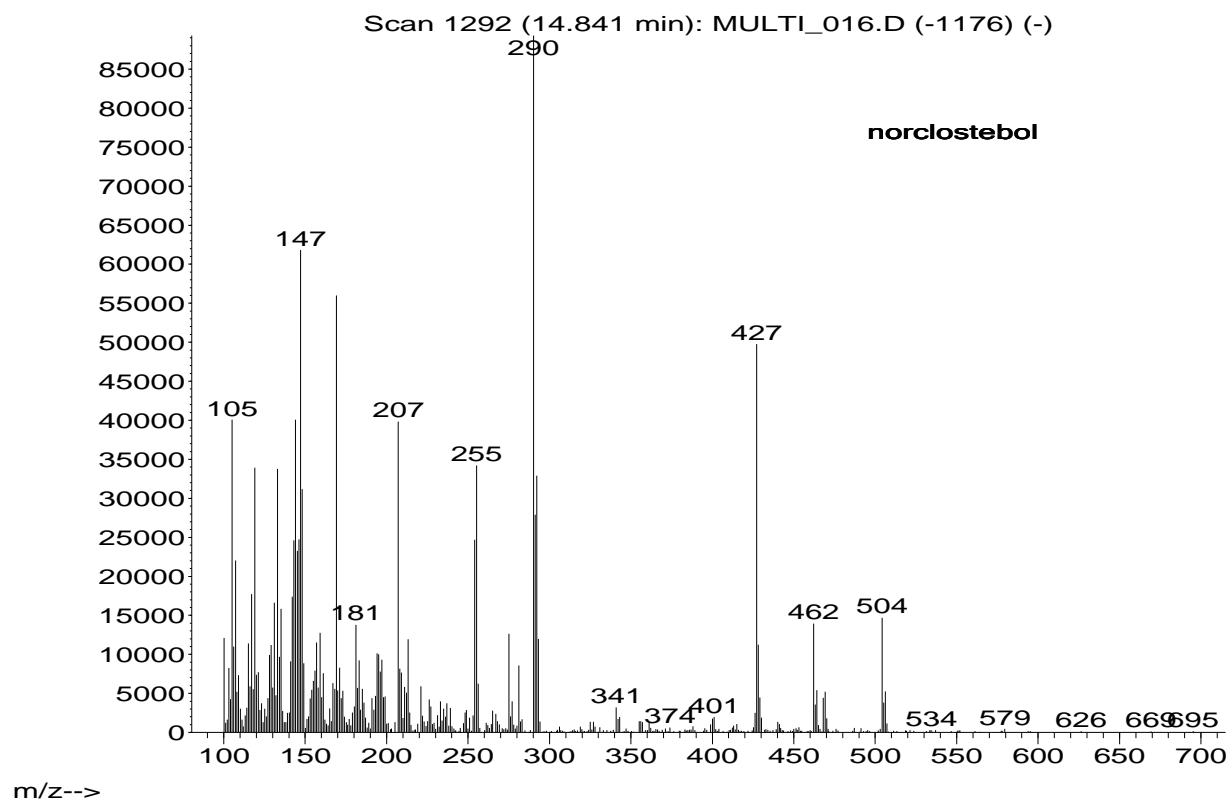
Graf 6: Spektrum  $\beta$ -boldenonu (HFBA derivát)

Abundance



Graf 7: Spektrum methylboldenonu (HFBA derivát)

Abundance



Graf 8: Spektrum norclostebolu (HFBA derivát)



## 4.4 Validace metody

### 4.4.1 Linearita metody

Linearita metody byla stanovena pro osm analytů, které byly nadávkovány do reálných vzorků kravské moči se stoupající koncentrací. Vzorky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.

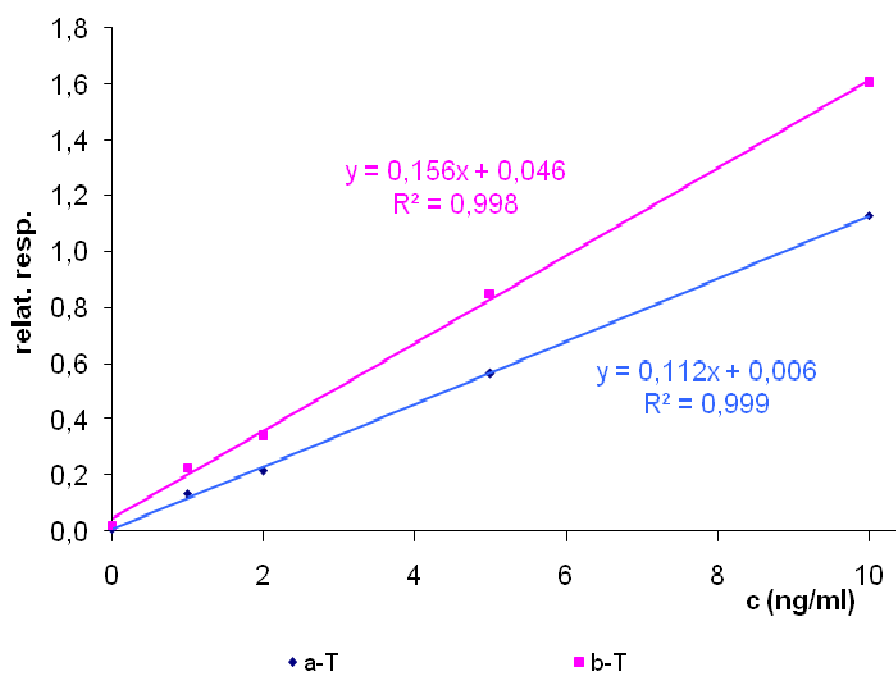
Z naměřených koncentrací analytů a poměrů ploch píků byly sestrojeny kalibrační přímky. Pomocí programu Excel MS byly pro jednotlivé kalibrační přímky vypočítány rovnice regrese ( $y = a + bx$ ) a hodnota korelačních koeficientů  $R^2$  (viz. tabulka č. 4). Kalibrační přímky pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v grafech 9-14. Linearita metody byla hodnocena jako dobrá, protože se hodnota spolehlivosti  $R^2$  blížila ideální 1.

Metoda je použitelná v rozsahu provedené kalibrace 0 až 10 ng/ml. Je tedy vhodná pro kvantifikaci steroidů v moči.

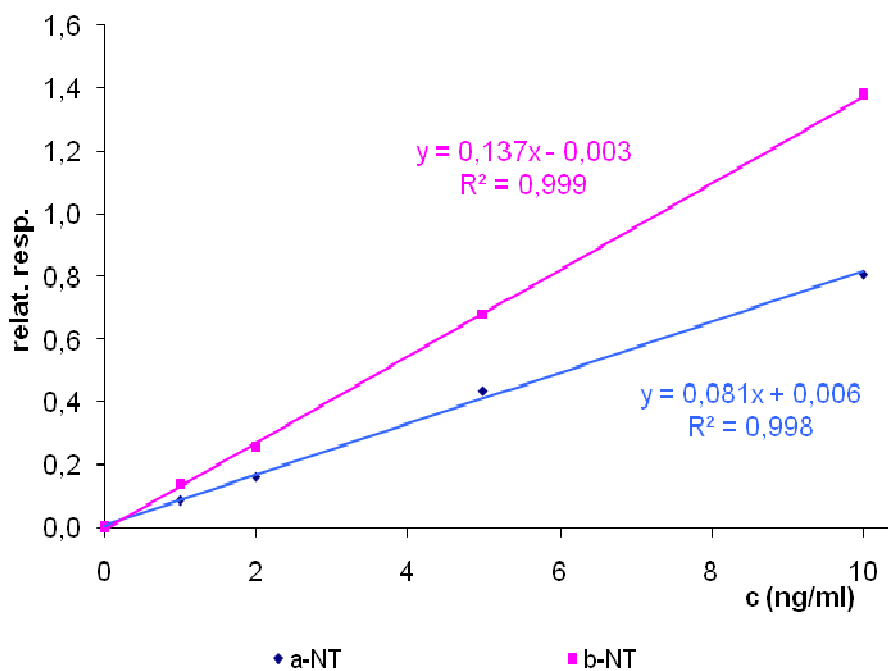
**Tabulka č. 4:** Hodnoty spolehlivosti a korelační koeficienty pro stanovení kalibračních řad v rozsahu koncentrací 0 až 10 ng/ml

Analyt	$y = ax + b$		
	$a$	$b$	$R^2$
$\alpha$ -testosteron	0,104	0,173	0,990
	0,120	0,000	0,986
	0,112	0,004	0,993
	0,112	0,006	0,999
	0,125	0,017	0,998
	0,125	0,015	0,998
	0,132	0,026	0,994
	0,132	0,026	0,994
$\beta$ -testosteron	0,172	0,042	0,999
	0,165	0,055	0,996
	0,156	0,431	0,999
	0,156	0,046	0,998
	0,164	0,055	0,997
	0,165	0,051	0,097
	0,181	0,077	0,998
	0,181	0,077	0,998
$\alpha$ -nortestosteron	0,106	-0,007	0,998
	0,092	0,013	0,998
	0,091	0,011	0,998
	0,118	0,017	0,998
	0,118	0,012	0,998
	0,121	0,040	0,994
	0,121	0,037	0,996
	0,081	0,006	0,998

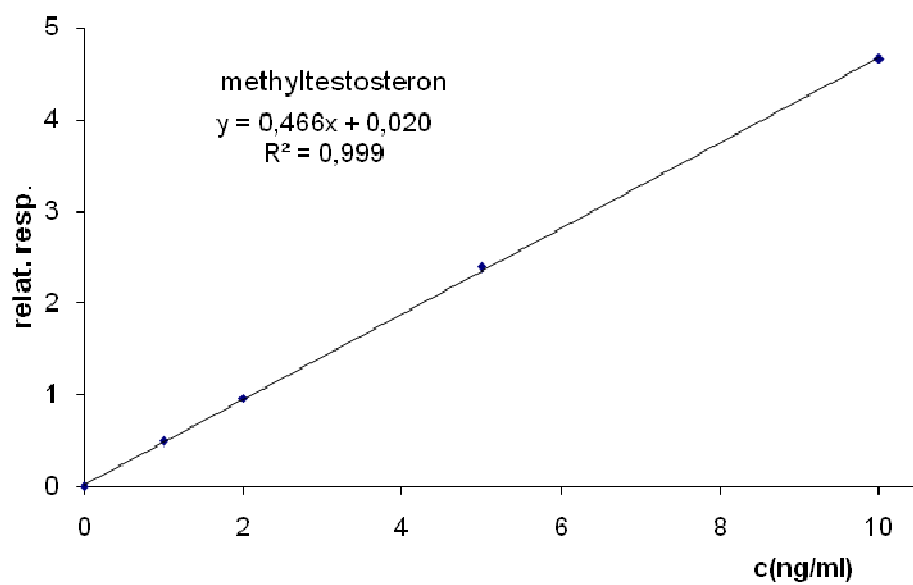
Analyt	$y = ax + b$		
	$a$	$b$	$R^2$
methyltestosteron	0,347	-0,008	0,999
	0,466	0,020	0,999
	0,333	0,013	0,997
	0,321	0,087	0,993
	0,357	0,054	0,998
	0,365	0,066	0,996
	0,413	0,069	0,999
	0,416	0,069	0,999
β-boldenon	0,183	0,023	0,999
	0,224	0,022	0,999
	0,213	-0,007	0,997
	0,215	-0,024	0,999
	0,216	0,004	0,999
	0,214	0,010	0,999
	0,222	0,005	0,999
	0,222	0,005	0,999
methylboldenon	0,299	-0,022	0,997
	0,265	0,027	0,999
	0,210	0,021	0,999
	0,208	0,028	0,999
	0,243	0,053	0,998
	0,233	0,053	0,993
	0,256	0,079	0,997
	0,279	0,055	0,998
norclostebol	0,106	0,009	0,989
	0,090	0,010	0,999
	0,065	0,029	0,994
	0,068	0,018	0,997
	0,076	0,013	0,998
	0,074	0,014	0,998
	0,080	0,023	0,997
	0,079	0,017	0,997



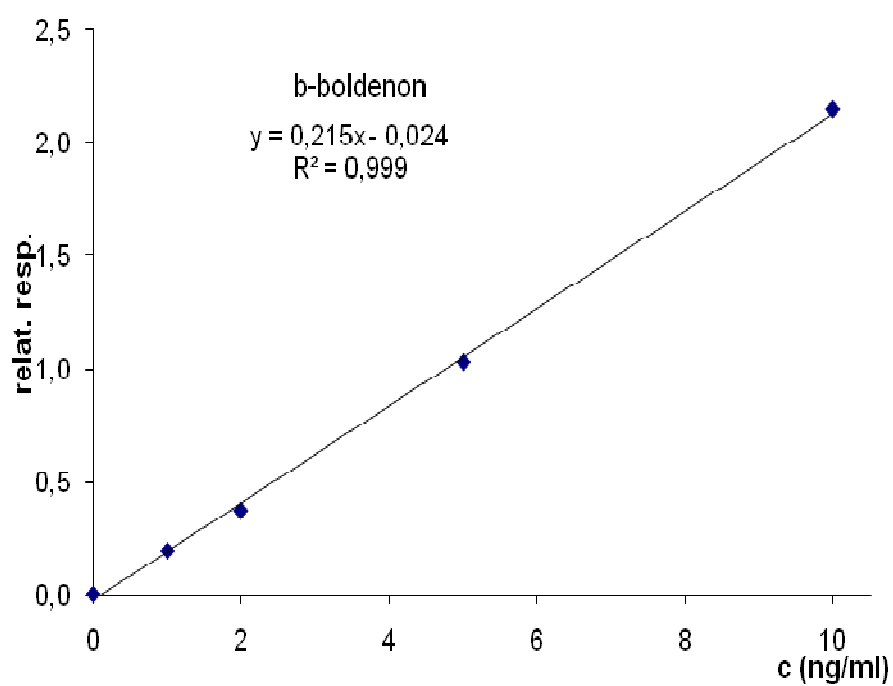
Graf 9: Kalibrační přímka  $\alpha+\beta$  testosteronu



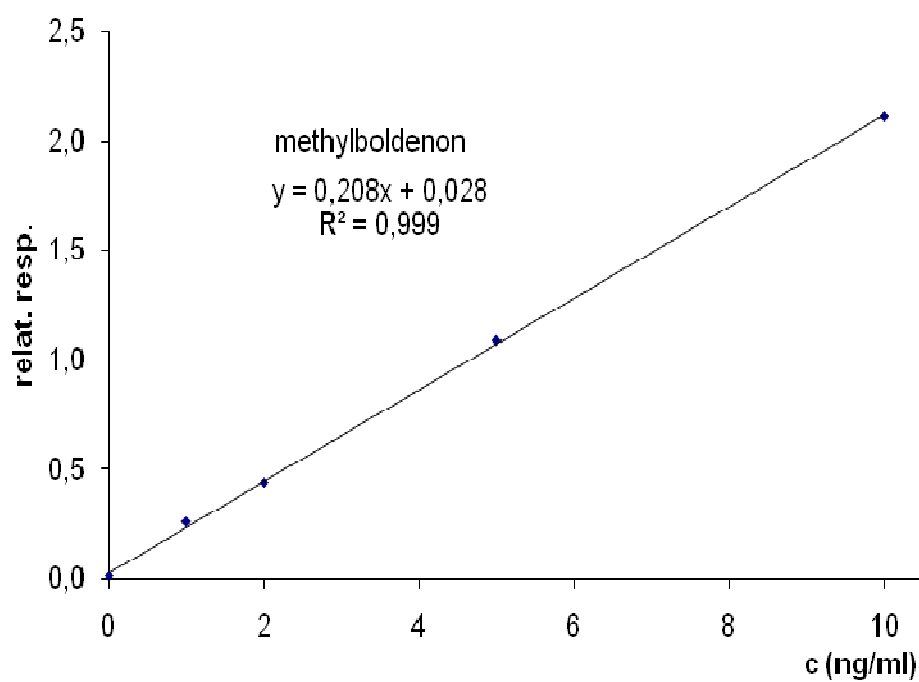
Graf 10: Kalibrační přímka  $\alpha+\beta$  nortestosteronu



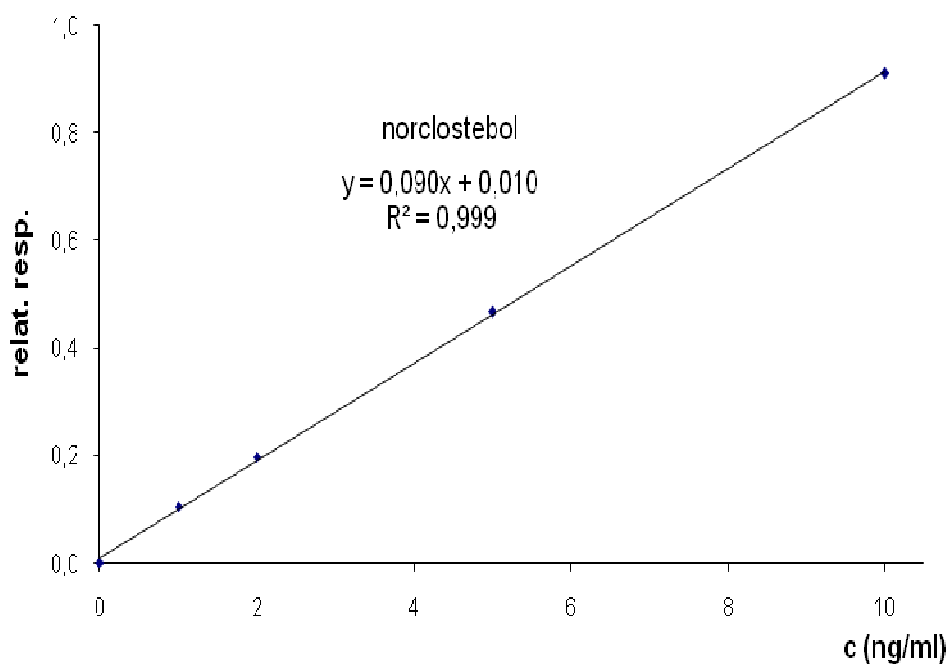
Graf 11: Kalibrační přímka methyltestosteronu



Graf 12: Kalibrační přímka  $\beta$ -boldenonu



Graf 13: Kalibrační přímka methyloboldenonu



Graf 14: Kalibrační přímka norclostebolu

#### 4.4.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost byla zjišťována na 20 vzorcích kravské moči s přidavkem analytů o koncentraci 2 ng/ml. Ze získaných měření byla vypočítána relativní standardní odchylka RSD. Můžeme konstatovat, že opakovatelnost metody je dobrá a metodu lze použít pro kvantitativní stanovení steroidů v moči. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 5.

**Tabulka č. 5:** Hodnoty odchylek v rámci opakovatelnosti metody

Analyt	Průměr	Směrodatná odchylka s	Relativní směrodatná odchylka RSD %
$\alpha$ -testosteron	0,299	0,0317	10,6
$\beta$ -testosteron	0,420	0,0334	8,0
$\alpha$ -nortestosteron	0,277	0,0244	8,8
$\beta$ -nortestosteron	0,347	0,0279	8,0
methyltestosteron	0,878	0,0801	9,1
methylboldenon	0,585	0,0484	8,3
$\beta$ -boldenon	0,404	0,0236	5,8
norclostebol	0,179	0,0245	13,7

#### 4.4.3 Robustnost metody

Metoda pro stanovení většího počtu analytů v reálném biologickém vzorku je použitelná pro moč hospodářských zvířat. Vzorky jsou díky ní dostatečně vyčištěné, vhodné pro jejich confirmaci.

#### 4.4.4 Správnost

Popisovaná metoda používá kvantifikaci metodou vnitřního standardu. Vnitřní standard je analyt značený stabilním izotopem. Jeho použití umožňuje eliminaci chyb. V našem případě se jednalo konkrétně o  $\beta$ -testosteron- $d_2$ ,  $\beta$ -nortestosteron- $d_3$ , methyltestosteron- $d_3$ ,  $\beta$ -boldenon- $d_3$ , methylboldenon- $d_3$  a chlortestosteron- $d_3$ , které byly přidány do vzorku moči k ostatním analytům.

#### 4.4.5 Selektivita

Selektivita je určena počtem měřených iontů hmotnostního spektra analytu. Pro confirmaci přítomnosti analytu ve vzorku se používají ionty (m/z) uvedené v tabulce č. 8.

#### 4.4.6 Stabilita

Zásobní roztoky steroidních analytů a jejich vnitřních standardů byly uchovávány při teplotě  $-20^\circ$ , v temnu. Pracovní roztoky byly připraveny vždy čerstvé. Vzorky moči se uchovávaly taktéž při  $-20^\circ\text{C}$ . Před vlastní analýzou se musely rozpustit při laboratorní teplotě. Měření vzorků následovalo ihned po derivatizaci.

#### 4.4.7 Vnitrolaboratorní reprodukovatelnost a výpočet limitu rozhodnutí CC $\alpha$ a detekční schopnosti CC $\beta$

Vzorky byly připraveny přidáním pracovních roztoků analytů do moči neobsahující tyto analyty dle postupu uvedeného v kapitole 3.3. Odchylna vnitrolaboratorní reprodukovatelnosti byla určena opakovaným stanovením analytů ve vzorcích moči o koncentracích 0, 1, 2, 5 a 10 ng/ml. Pro každou koncentraci bylo provedeno šest paralelních stanovení. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 6.

Pro látky, u kterých nejsou legislativně stanoveny limity MRL ani MRPL, jsou navrhované hodnoty CC $\beta$  pro screeningové metody a CC $\alpha$  pro konfirmační metody uvedeny v materiálech SANCO - Generálního ředitelství pro zdraví a ochranu spotřebitele [30]. Naměřené koncentrace musí být nižší než doporučené hodnoty. Všechny vypočtené hodnoty CC $\alpha$  i CC $\beta$  stanovovaných analytů těmto požadavkům vyhovovaly.

**Tabulka č. 6:** Zjištěné hodnoty CC $\alpha$  CC $\beta$  jednotlivých analytů

Analyt	CC $\alpha$	CC $\beta$
17 $\alpha$ -testosteron	0,302	0,505
17 $\beta$ -testosteron	0,203	0,339
17 $\alpha$ -nortestosteron	0,450	0,753
17 $\beta$ -nortestosteron	0,285	0,476
17 $\beta$ -boldenon	0,168	0,281
methyloboldenon	0,349	0,583
methytestosteron	0,337	0,564
norclostebol	0,435	0,727

#### 4.5 Konfirmace

Pokud má některý vzorek v retenčním čase sledovaného analytu pík, provede se opakované měření intenzit čtyř iontů, které jsou vhodné pro identifikaci příslušného analytu. Konfirmace, tedy potvrzení přítomnosti analytu ve vzorku, se provede srovnáním ploch píků čtyř iontů naměřených v analyzovaném vzorku a ve vzorku moči s přídatkem zhruba stejné koncentrace analytu. Tím se získají tři poměry relativních intenzit iontů a pro jejich vyhodnocení se použijí stanovené hodnoty (viz. tabulka č. 7) ze směrnice 2002/657/EC.

Relativní intenzity iontů a jejich vzájemné poměry jsou uvedeny v tabulce č. 9.

**Tabulka č. 7:** Maximální povolené tolerance pro relativní intenzity iontů

Relativní intenzita	EI-GC-MS	CI-GC-MS, GC-MS, LC-MS <sup>n</sup> , LC-MS <sup>n</sup>
>50%	± 10%	± 20%
>20% do 50%	± 15%	± 25%
>10% do 20%	± 20%	± 30%
≤10	± 50%	± 50%

**Tabulka č. 8:** Vybrané m/z pro konfirmaci

Sledované ionty	Pro identifikaci	Pro kvantifikaci	Pro ISTD
17 $\alpha$ -testosteron	451, 467, 665, 680	680	682
17 $\beta$ -testosteron	451, 467, 665, 680	680	682
17 $\alpha$ -nortestosteron	306, 453, 666, 667	666	669
17 $\beta$ -nortestosteron	306, 453, 666, 667	666	669
17 $\beta$ -boldenon	343, 369, 464, 678	678	681
methylboldenon	367, 435, 463, 478	478	481
methyltestosteron	355, 369, 465, 480	480	483
norclostebol	255, 290, 292, 427	427	-
chlortestosteron-d <sub>3</sub>	-	-	485

**Tabulka č. 9:** Relativní intenzity iontů a jejich vzájemné poměry

Analyt	Měřené hodnoty	m/z						
$\alpha$ -testosteron		680	665	467	451	665/680	467/680	451/680
	kal. 5ng/ml	374490	62292	123498	68293	0,166	0,330	0,182
	kal. 10ng/ml	805475	135789	267532	144445	0,169	0,332	0,179
	horní mez					0,191	0,379	0,210
	dolní mez					0,163	0,280	0,155
$\beta$ -testosteron		680	665	467	451	665/680	467/680	451/680
	kal. 5ng/ml	469661	97359	279024	111284	0,207	0,594	0,237
	kal. 10ng/ml	936577	194142	515860	217017	0,207	0,551	0,232
	horní mez					0,238	0,654	0,272
	dolní mez					0,176	0,535	0,201
$\alpha$ -nortestosteron		666	667	453	306	667/666	453/666	306/666
	kal. 5ng/ml	179019	61925	79068	44485	0,314	0,401	0,226
	kal. 10ng/ml	491463	154950	196003	107714	0,315	0,399	0,219
	horní mez					0,361	0,462	0,260
	dolní mez					0,267	0,341	0,192



Analyt	Měřené hodnoty	m/z						
<b>β-nortestosteron</b>		<b>666</b>	<b>667</b>	<b>453</b>	<b>306</b>	<b>667/666</b>	<b>453/666</b>	<b>306/666</b>
	kal. 5ng/ml	270769	85562	88174	105536	0,316	0,326	0,390
	kal. 10ng/ml	610239	190169	197461	236483	0,312	0,324	0,388
	horní mez					0,363	0,374	0,448
	dolní mez					0,269	0,277	0,331
<b>methyldtestosteron</b>		<b>480</b>	<b>465</b>	<b>369</b>	<b>355</b>	<b>465/480</b>	<b>369/480</b>	<b>355/480</b>
	kal. 5ng/ml	371739	325651	155060	106719	0,876	0,417	0,287
	kal. 10ng/ml	831457	736491	362847	255507	0,886	0,436	0,307
	horní mez					0,964	0,480	0,330
	dolní mez					0,788	0,355	0,244
<b>methyldboldenon</b>		<b>478</b>	<b>463</b>	<b>435</b>	<b>367</b>	<b>478/367</b>	<b>463/367</b>	<b>435/367</b>
	kal. 5ng/ml	204197	253199	450993	63748	0,453	0,561	0,141
	kal. 10ng/ml	395216	503612	890519	132635	0,444	0,566	0,149
	horní mez					0,521	0,618	0,170
	dolní mez					0,385	0,505	0,113
<b>β-boldenon</b>		<b>678</b>	<b>464</b>	<b>369</b>	<b>343</b>	<b>464/678</b>	<b>369/678</b>	<b>343/678</b>
	kal. 5ng/ml	383919	245490	180230	173470	0,639	0,469	0,452
	kal. 10ng/ml	817791	522216	373643	373643	0,639	0,457	0,431
	horní mez					0,703	0,540	0,520
	dolní mez					0,575	0,399	0,384
<b>norclostebol</b>		<b>380</b>	<b>365</b>	<b>344</b>	<b>290</b>	<b>255</b>	<b>380/290</b>	<b>365/290</b>
	kal. 5ng/ml	120109	154026	89513	237734	152297	0,505	0,648
	kal. 10ng/ml	280047	342617	193609	567785	349990	0,493	0,603
	horní mez						0,543	0,664
	dolní mez						0,444	0,543

## 4.6 Srovnání metody s metodou používanou institutem RIVM

Holandský institut RIVM publikoval metodu na stanovení steroidů v moči hospodářských zvířat pomocí GC-MS. Jejich postup byl však ve srovnání s naším pracnějším, náročnějším a poskytoval horší výsledky.

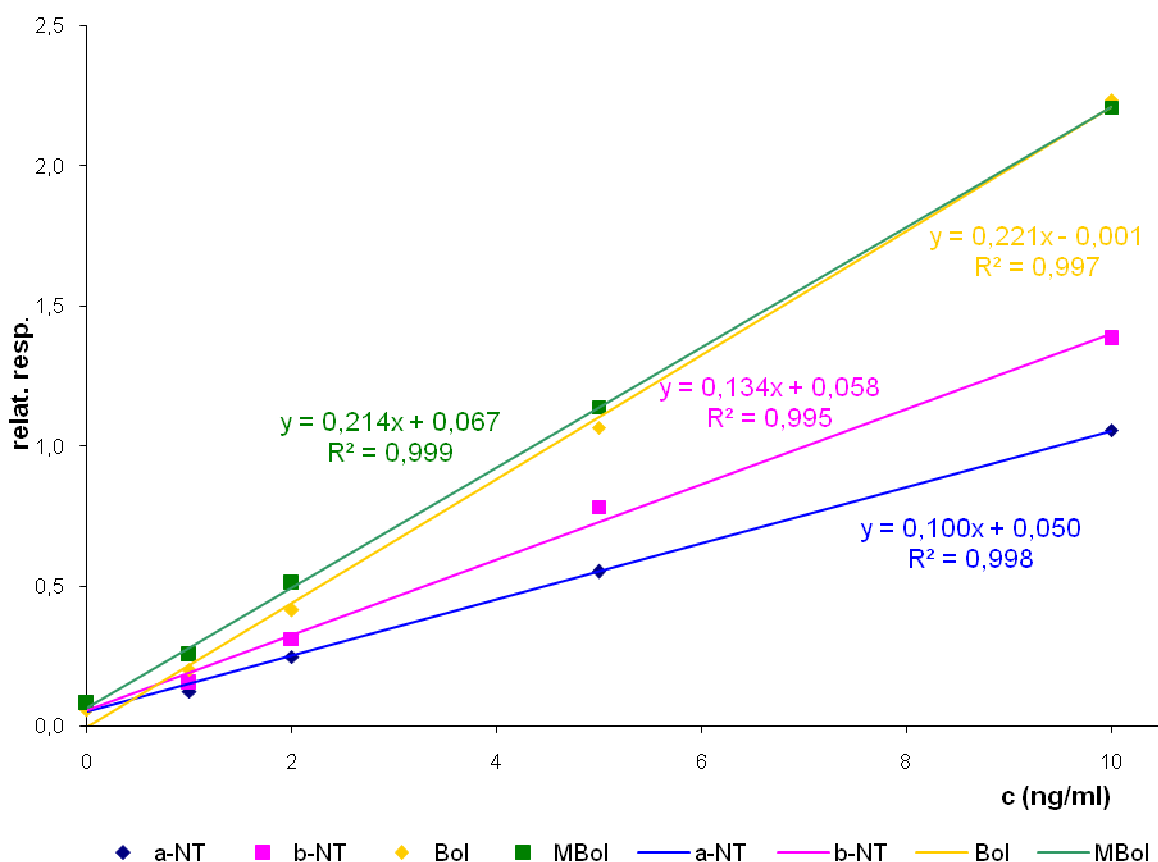
Rozdíly v provedení celé metody spočívaly v použití kombinace extrakce tuhou fází s extrakcí kapalina/kapalina, následovala derivatizace, GC separace a detekce MS. V této diplomové práci postup zahrnoval přípravu extraktu na koloně Extrelut, přečištění na koloně aluminy, derivatizaci, GC separaci a detekci MS. Derivatizaci provedl RIVM pomocí anhydridu kyseliny heptafluoromáselné (HFBA) a N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamidu (MSTFA) [28].

## 4.7 Vyšetření neznámých vzorků

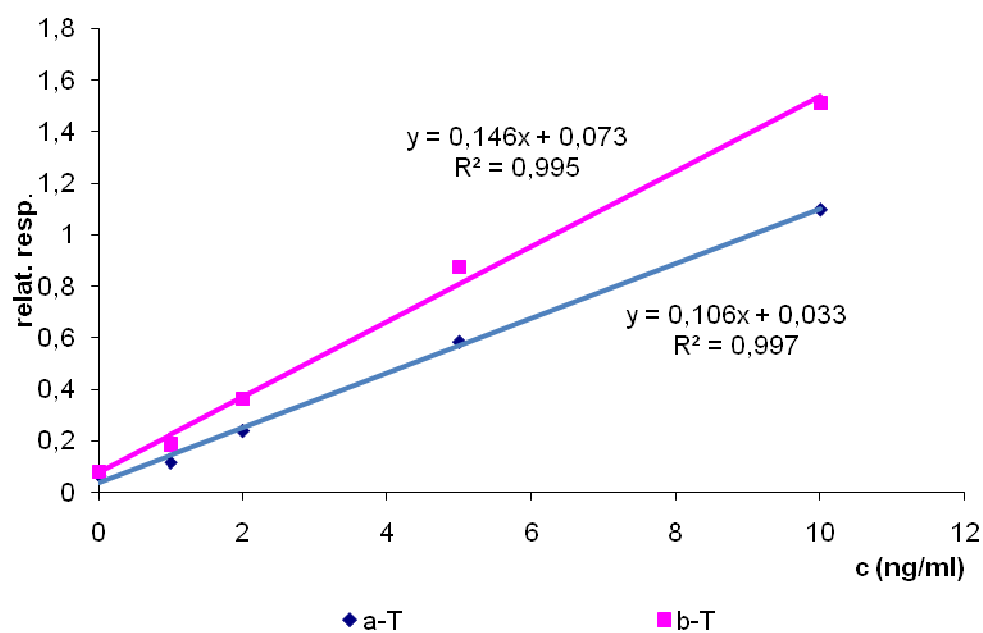
### Kalibrace

Reálné vzorky kravské moči byly nejdříve dekonjugovány  $\beta$ -glukuronidasou a dále připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.

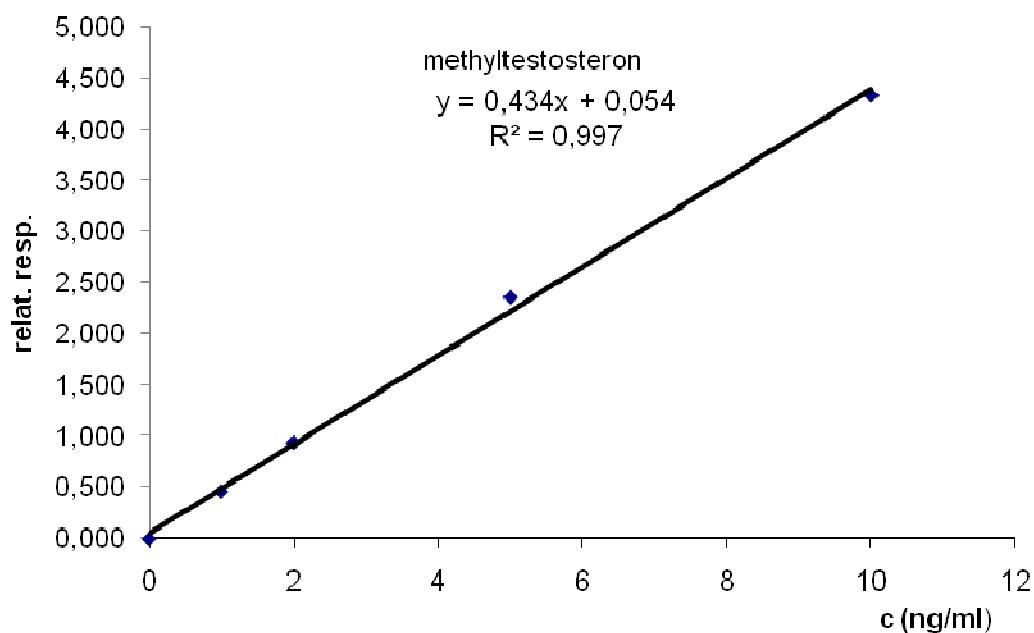
Pro sestavení kalibrační řady bylo ke 3 ml moči přidáno 0 až 10 ng/ml standardů steroidních analytů (viz. kapitola 3.3.1). Kalibrační přímky jednotlivých steroidů jsou uvedeny v grafech 15-18.



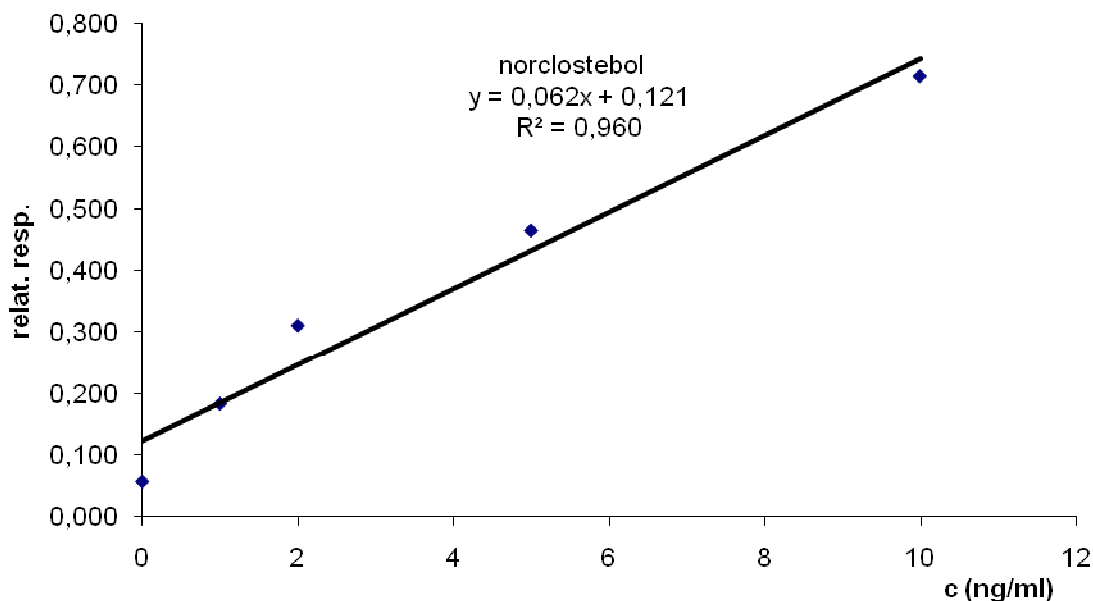
Graf 15: Kalibrační přímka a+b nortestosteronu, b-boldenonu a methylboldenonu pro vyšetření rutinních vzorků moči



Graf 16: Kalibrační přímka  $\alpha$  +  $\beta$  testosteronu pro vyšetření rutinních vzorků moči



Graf 17: Kalibrační přímka methyltestosteronu pro vyšetření rutinních vzorků moči



*Graf 18: Kalibrační přímka norclostebolu pro vyšetření rutinních vzorků moči*

### Výsledky po prvním měření

Třicet sedm ze čtyřiceti měřených vzorků v příslušných retenčních časech nedávaly žádné píky, a proto byly vyhodnoceny jako vyhovující. U tří vzorků však vzniklo podezření na přítomnost sledovaných analytů, a proto byly následně podrobeny confirmaci, čili měření na čtyřech iontech, aby se potvrdila nebo vyloučila přítomnost steroidů jako následek záměrného podání zvířatům či jako důsledek nedokonale provedené kastrace.

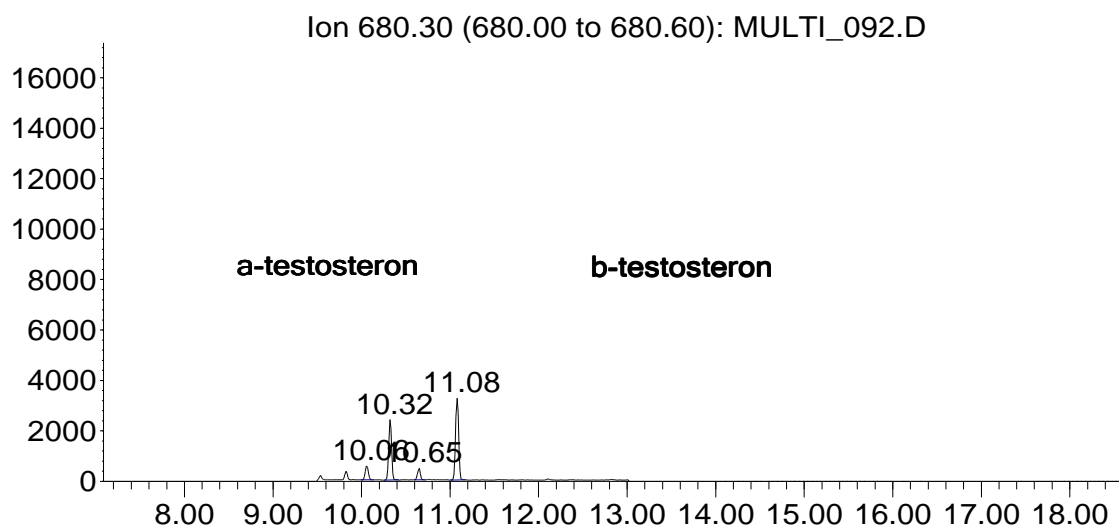
### Konfirmace podezřelých vzorků

Podezřelé vzorky byly znovu připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 3.3. Měření byla provedena na čtyřech iontech pro každý analyt dle tabulky 8. Pro potvrzení přítomnosti sledovaných látek by při tomto měření musely být zjištěny v retenčních časech příslušných analytů píky, jejichž poměry ploch by odpovídaly poměrům uvedeným v tabulce 9.

Konfirmace nepotvrdila přítomnost nepovolených látek, jelikož u žádného z podezřelých vzorků kravské moči nebyly nalezeny odpovídající poměry ploch pík iontů. Tím nebyla splněna podmínka pro confirmaci nálezů látek zakázaných při výkrmu hospodářských zvířat a vzorky byly vyhodnoceny jako vyhovující.

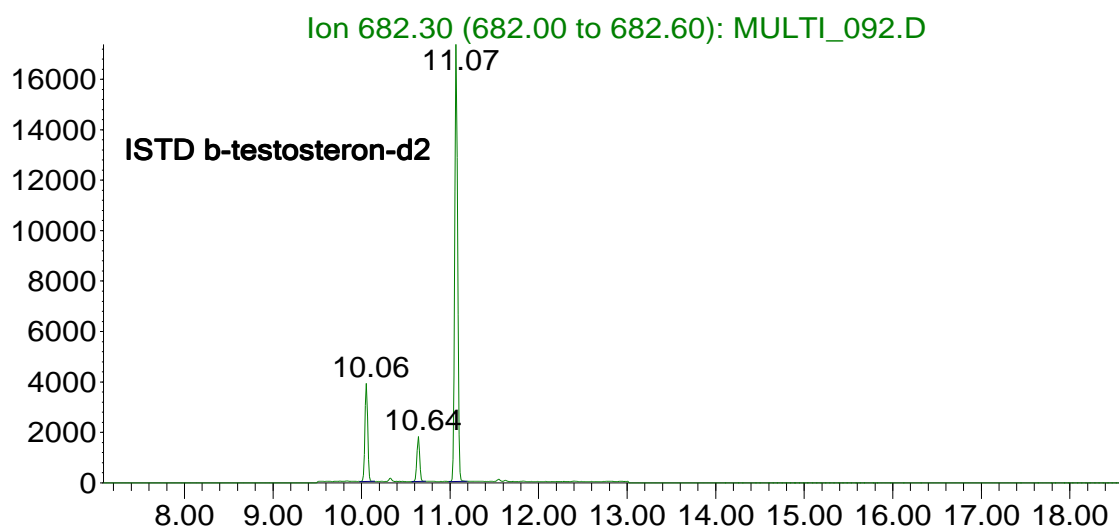
V grafech 19 – 24 jsou ukázky chromatogramů jednotlivých analytů a jejich vnitřních standardů na nízké koncentrační úrovni při stanovení v moči.

Abundance



Time-->

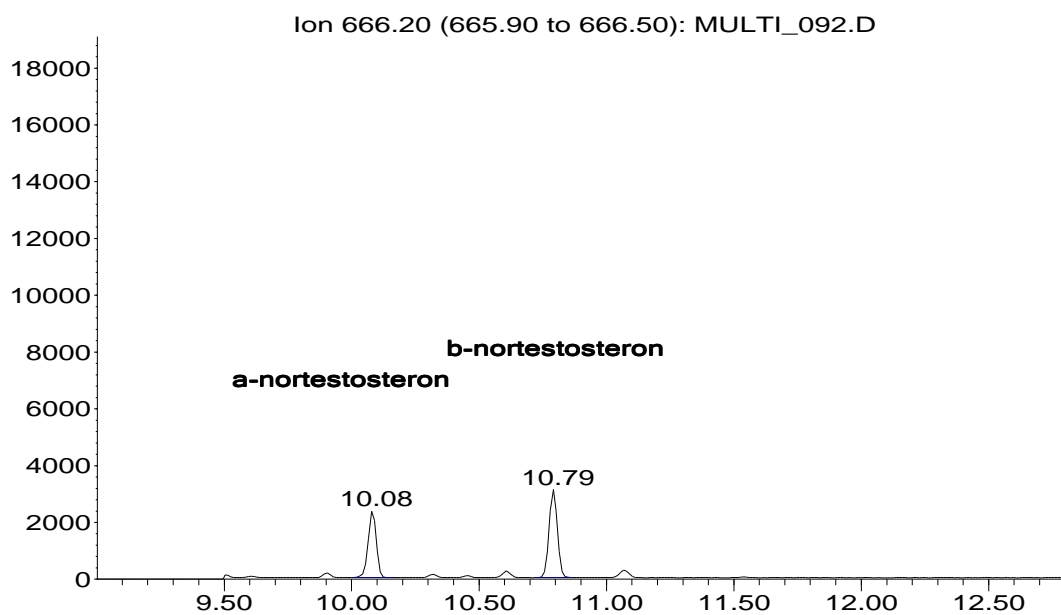
Abundance



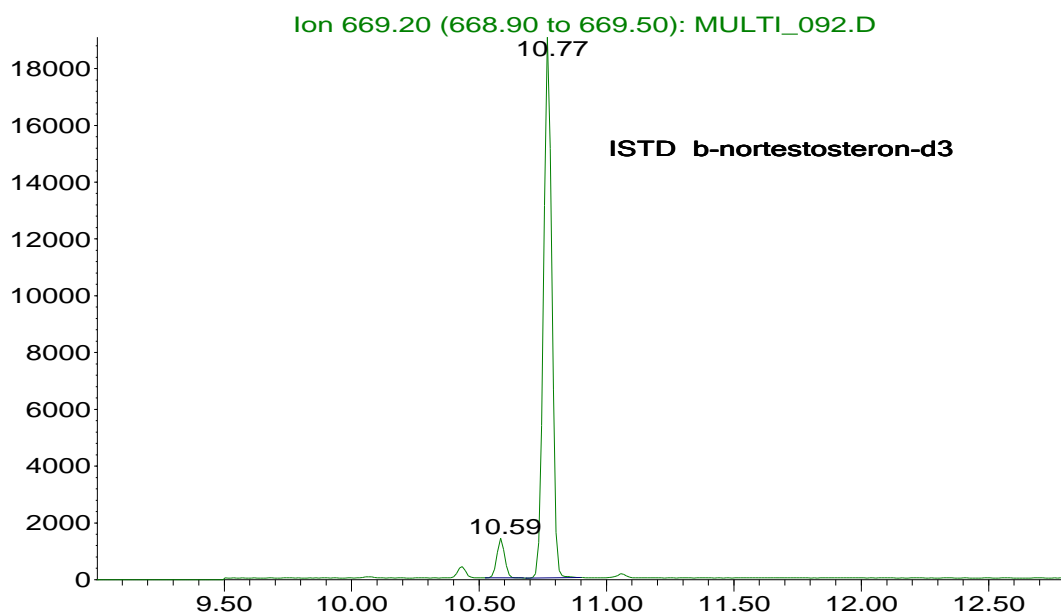
Time-->

*Graf 19: Chromatogram standardů  $\alpha$  +  $\beta$  testosteronu (o koncentraci 1 ng/ml) a jejich vnitřního standardu (5 ng/ml) z kalibrace moči*

Abundance



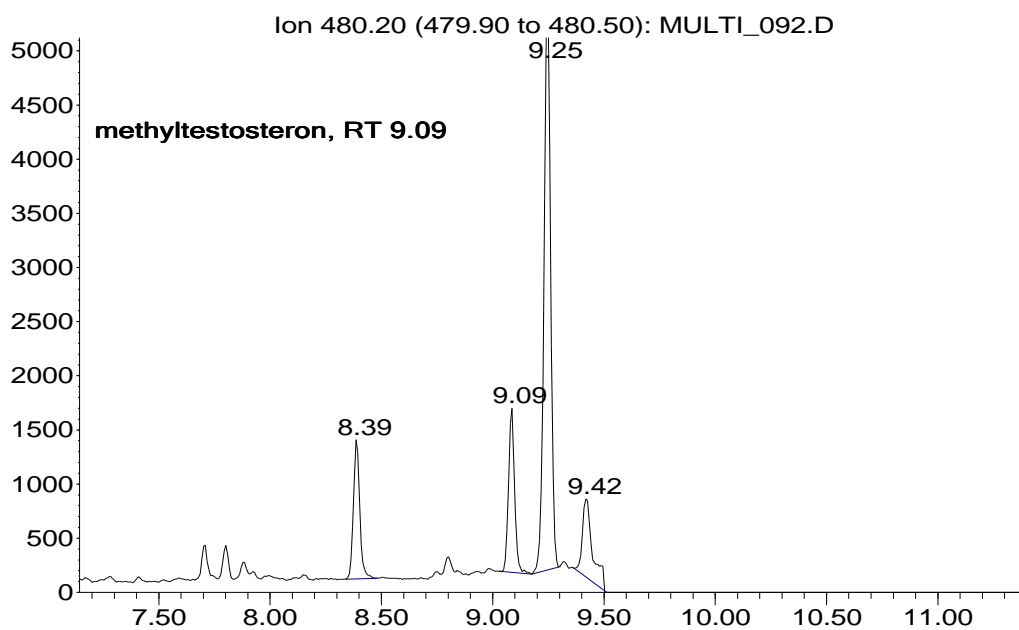
Time-->  
Abundance



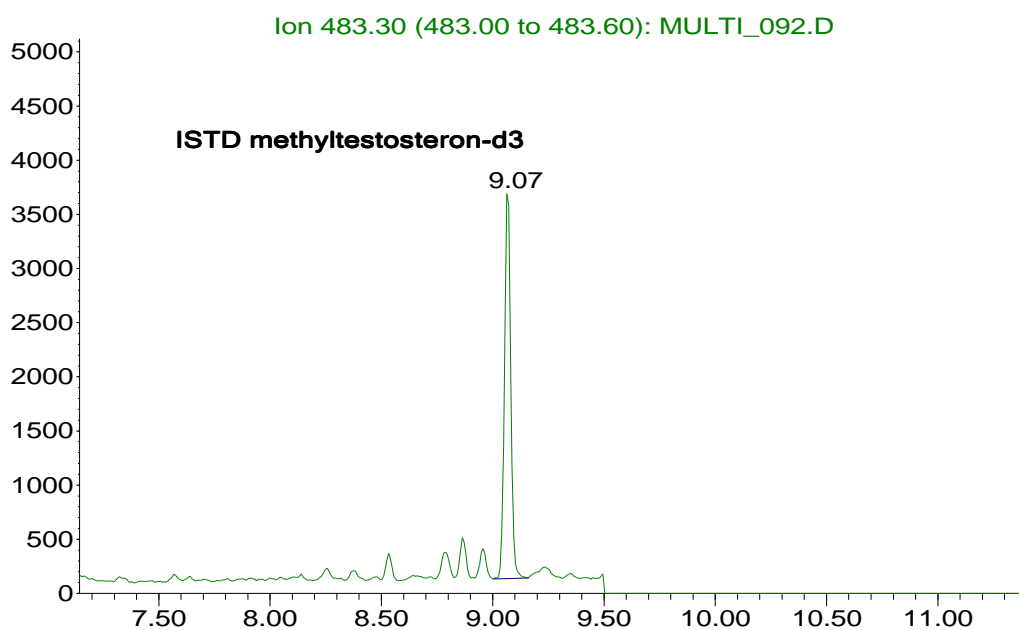
Time-->

*Graf 20: Chromatogram standardů  $\alpha$  +  $\beta$  nortestosteronu (o koncentraci 1 ng/ml) a jejich vnitřního standardu (5 ng/ml) z kalibrace moči*

Abundance

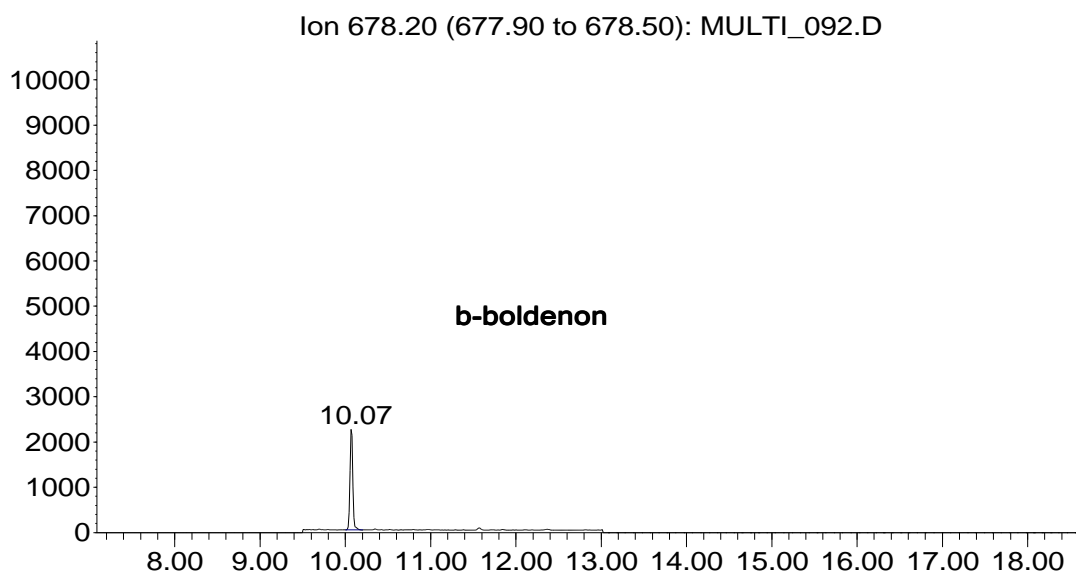


Abundance

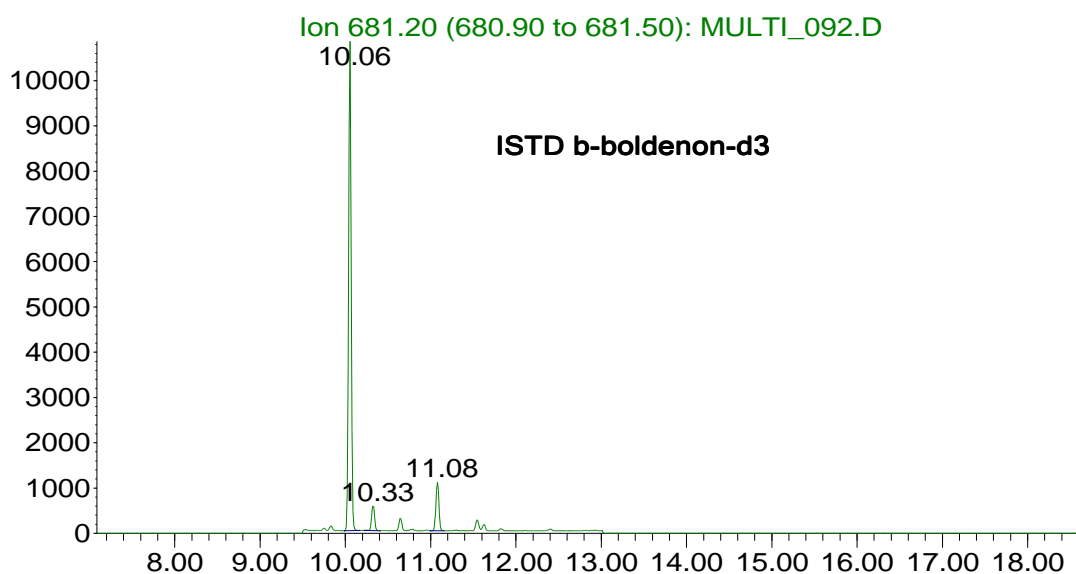


*Graf 21: Chromatogram standardu methyltestosteronu (o koncentraci 1 ng/ml) a jeho vnitřního standardu (5 ng/ml) z kalibrace moči*

Abundance



Time-->  
Abundance

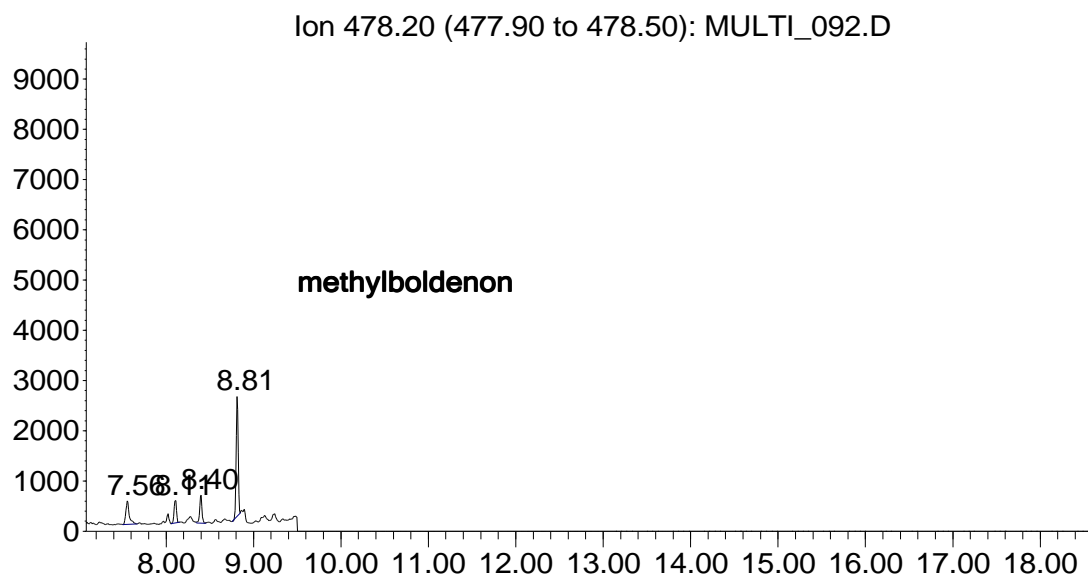


Time-->

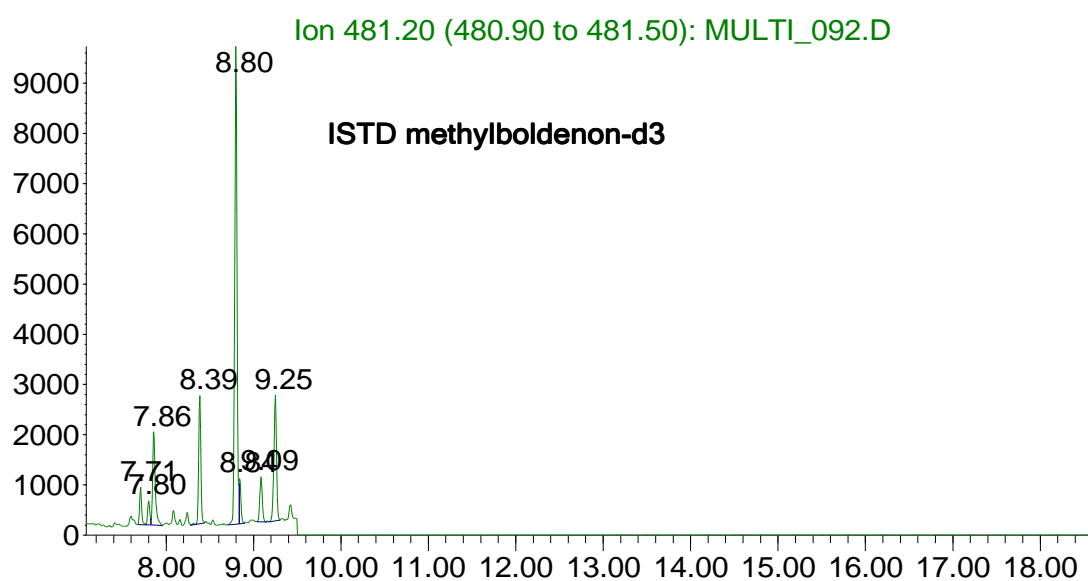
*Graf 22: Chromatogram standardu  $\beta$ -boldenonu (o koncentraci 1 ng/ml) a jeho vnitřního standardu (5 ng/ml) z kalibrace moči*



Abundance



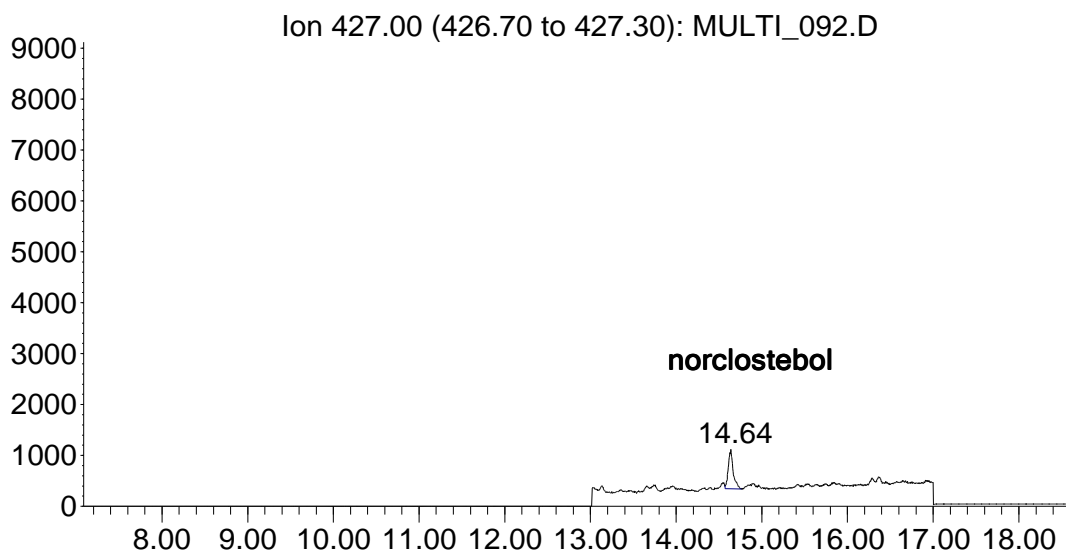
Time-->  
Abundance



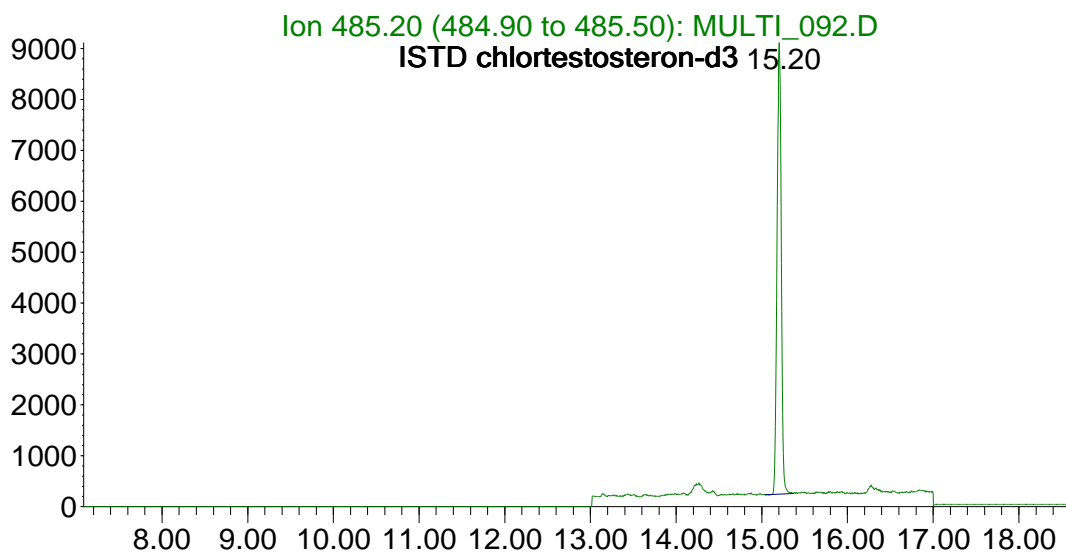
Time-->

*Graf 23: Chromatogram standardu methylboldenonu (o koncentraci 1 ng/ml) a jeho vnitřního standardu (5 ng/ml) z kalibrace moči*

Abundance



Time-->  
Abundance



Time-->

*Graf 24: Chromatogram standardu norclostebolu (o koncentraci 1 ng/ml) a jeho vnitřního standardu (5 ng/ml) z kalibrace moči*

## 5 ZÁVĚR

Tato diplomová práce se věnovala problematice výskytu a stanovení hormonálně účinných látek v biologickém materiálu. V rámci experimentální části se zabývala zavedením a validováním vhodné metody pro stanovení nízkých koncentrací steroidů v moči hospodářských zvířat. Tzv. „multi metoda“ umožňuje stanovení více analytů v jednom vzorku současně.

Popisovaná metoda je vhodná pro kvantifikaci steroidů v moči v rozsahu prováděných kalibrací 0 až 10 ng/ml. Metoda používá kvantifikaci metodou vnitřního standardu.

Opakovatelnost byla zjišťována na 20 vzorcích kravské moči s přidavkem analytů o koncentraci 2 ng/ml. Celá metoda dávala dobrou opakovatelnost s  $RSD \leq 10\%$  pro většinu analytů.

Pro látky, u kterých nejsou legislativně stanoveny limity MRL ani MRPL, jsou navrhované hodnoty  $CC\beta$  pro screeningové metody a  $CC\alpha$  pro konfirmační metody uvedeny v materiálech Generálního ředitelství pro zdraví a ochranu spotřebitele SANCO. Hodnoty stanovené při validaci nově zaváděné metody musí být nižší než hodnoty doporučené. Všechny získané a vypočítané hodnoty  $CC\alpha$  a  $CC\beta$  stanovovaných analytů těmto požadavkům vyhovovaly.

Konfirmace, neboli potvrzení přítomnosti analytu ve vzorku, se provedla srovnáním ploch píků čtyř iontů naměřených v analyzovaném vzorku a ve vzorku moči s přidavkem zhruba stejné koncentrace analytu. Tím se získaly tři poměry relativních intenzit iontů a pro jejich vyhodnocení se použijí stanovené hodnoty ze směrnice 2002/657/EC.

Metoda byla také použita pro vyšetření čtyřiceti neznámých vzorků kravské moči. Spolehlivě odstranila veškeré možné rušící nečistoty, poskytla jednoznačné výsledky. Všechny vzorky byly vyhodnoceny jako vyhovující.

Na závěr lze tedy konstatovat, že zjištěné parametry metody odpovídaly předpokládaným hodnotám. Metoda vykazovala všechny platnou legislativou požadované vlastnosti. Jednotlivé analyty byly spolehlivě a jednoznačně identifikovány, poskytovaly výrazné, symetrické a dobře oddělené píky.

Metoda může sloužit nejen ke screeningovému stanovení skupiny některých steroidních hormonálně účinných látek v moči hospodářských zvířat, ale splňuje i kritéria konfirmačních metod určených pro sledování reziduí hormonálně účinných látek v biologickém materiálu dle Směrnice Rady 2002/657/EC.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Hanč, O., Pádr, Z.: *Hormony. Úvod do jejich chemie a biologie*. Praha: Academia, 1982, 856 str. ISBN 2-304.736-82.
- [2] Pyšný, L.: *Zdravotní rizika zneužití anabolických steroidů*. Ústí nad Labem: Karolinum, 1198, 87 str. ISBN 80-7044-192-5.
- [3] Velíšek, J.: *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 1999, 368 str. ISBN 80-902391-5-3.
- [4] Klouda, P.: *Základy biochemie*. Ostrava: Pavel Klouda, 2005. ISBN 80-86369-11-0.
- [5] Serratos, J.; Blass, A.; Rigau, B.; Mongrell, B.; Rigau, T.; and col.: *Residues from veterinary medicinal products, growth promoters and performance enhancers in food-producing animals: a European Union perspective*. Rev.sci.tech.Off.int.Epiz., 2006, vol. 25, no. 2, pp.637-653.
- [6] Seo Jungju; Kim Hye-Young; Chung Bong Chul; Hong Jongki: *Simultaneous determination of anabolic steroids and synthetic hormones in meat by freezing-lipid filtration, solid-phase and gas chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 2005, vol. 1067, no. 1-2, pp. 303-309. ISSN 0021-9673.
- [7] Stephany, R., W.; Sterk, S., S.; Van Ginkel, L., A.: *Tissue levels and dietary intake of endogenous steroids an overview with emphasis on 17beta-estradiol*. The Netherlands: Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, pp. 111-119.
- [8] Pedersen, M.; Orntoft, I.: *"Natural levels" of oestradiol, testosterone and progesterone found in pigs and cows in Denmark from 1995-2001*. Denmark: Danish Food and Veterinary research, National Reference Laboratory, pp. 738-742.
- [9] Herbold, H. and col.: *An overview of different aspects dealing with the analysis of androgenic anabolic steroids*. The Netherlands: RIVM, 2004, pp.1-33.
- [10] Ruiz-Gutiérrez, V.; Pérez-Camino, M.C.: *Update on solid-phase extraction for the analysis of lipid classes and related compounds*. Journal of Chromatography A, 2000, vol. 885, no. 1-2, pp. 321-341. ISSN 0021-9673.
- [11] Kodeš, A. A kol: *Moderní systémy výživy skotu*. České Budějovice: Ministerstvo zemědělství a výživy ČR, 1990. 195 str. ISBN 80-7084-024-2.
- [12] Fraiss, Z.: *Zoohygiena a prevence onemocnění dojníc*. Brno: Vysoká škola zemědělská v Brně, 1983.
- [13] Takáčsová, M.: *Chémia potravin*. Bratislava:, STU, 1996, 233 s. ISBN 80-2270-8615.
- [14] Vodrážka, Z.: *Biochemie*. 2. vyd. Praha: Academia, 1999. 191 s. ISBN 80-200-0600-1.
- [15] Příbela, A.: *Analýza potravin*. 1. vyd. Bratislava: Slovenská technická univerzita, 1991. 225 s. ISBN 80-227-0374-5.
- [16] Firemní materiály společnosti RIVM, Standard Operation Procedure SOP/ARO 479: *Analysis of anabolic steroids in bovine urine with GC-MS* (The Netherlands): RIVM, 2005.
- [17] Botsoglou, N., A.; Fletorius, D., J.: *Drug residues in fous. Pharmacology, Food Safety, and Analysis*. Greece: Aristotle University Thessaloniki, 2006, pp.193-206.

- [18] Suchánek, Plzák, Šubrt, Koruna: *Kvalimetrie, díl 7. Validace analytických metod*. Praha: EURACHEM-ČR, 1997, 137 str. ISBN 80-901868-2-3.
- [19] Firemní katalog společnosti Phenomenex, SPE Reference. Manual & Users Guide, Torrance (USA): Phenomenex, 2003.
- [20] Firemní katalog společnosti Labicom s. r. o., SPE Catalog. Applied Separations, Olomouc(CZ) : Labicom, 2004.
- [21] Firemní materiály společnosti Merck, Extrelut NT(Germany): Merck, 2006.
- [22] Firemní katalog společnosti Waters, Oasis<sup>®</sup> Applications Notebook. Agrochemical Food Pharmaceuticals Forencics Environmental, Milford Massachusetts (USA): Waters, 2003.
- [23] Firemní katalog společnosti ANSYS, SPEC. The optimum in Solid phase extraction. Products & Accesories Catalog, Canonsburg (USA): ANSYS, 1999.
- [24] Barek, J., Jánoš, P. a kol.: *Nomenklatura a terminologie*. Chemické listy 94, 2000, s. 439-444.
- [25] Pyšný, L.: *Doping, zdraví, výkon*. Praha: Karolinum, 1999. 99 s. ISBN 80-7184-813-1.
- [26] Vítová, E.: *Hygienu potravin*. Brno: FCH VUTBR, 2004. str.94-95. ISBN80-214-2680-2.
- [27] Commission staf working document. On the implementation of national residue monitoring plans in the member states in 2005. Commission of the European Communities, Brusel, 2007, pp. 231.
- [28] Marco A. Jonker and Leendert A. van Ginkel: *Evaluation results 2005 / ANPs 2006 for groups A1, A2, A3, and A4*. RIVM, 2007, pp. 33.
- [29] Draft report for 2006 on the results of residue monitoring in food of animal origin in the Member states. SANCO, 2008, pp. 42.
- [30] CRLs view on the state of the art analytical mehdods for the national residue plans for control of residues. SANCO/3228, 2006, pp. 10.
- [31] Official Journal of the European Communities L221, 17.8.2002, p.8. Commission decision 2002/657/EC.
- [32] Official Journal of the European Communities L171, 15.3.2003, p.17. Commission decision 2003/181/EC.
- [33] Official Journal of the European Communities L125, 23.5.1996, p.3. Commission decision 96/22/EC.
- [34] Official Journal of the European Communities L125, 23.5.1996, p.10. Commission decision 96/23/EC.
- [35] Vyhláška č. 291/2003 Sb. O zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o sledování (monitoring) přítomnosti nepovolených látek, reziduí, a látek kontaminujících, pro něž by živočišné produkty mohly být škodlivé pro zdraví lidí, u zvířat a v jejich produktech.
- [36] Churáček, J. a kol.: *Analytická separace látek*. Praha: SNTL, 1990. 369 s. ISBN 80-03-00569-8.

- [37] Klouda, P.: *Moderní analytické metody*. Ostrava: Pavel Klouda , 2003. ISBN 80- 86369-072.
- [38] Němcová, I., Engst, P., Jelínek, I., Sejbal, J., Rychlovský, P.: *Spektrometrické analytické metody II*: Praha: Karolinum, 1998, 162 str. ISBN 80-7184-586-8.
- [39] Suchánek, M., Fogl, J., Karhan, J.: *Analytická chemie I*. Praha: VŠCHT, 1991, 182 s. ISBN 80-7080-086-0.
- [40] Smolková, E; Feltl, L.; Pacáková, E.: *Plynová chromatografie I*. Praha: Univerzita Karlova, 1983, 108 s.
- [41] Stužka, V.: *Instrumentální metody Chemické analýzy II. Hmotnostní spektrometrie organických molekul*. Olomouc: Vydavatelství Univerzity Palackého, 1996, 108 str. ISBN 80-7067-613-2.
- [42] Holčápek, M.: *Hmotnostní spektrometrie v organické analýze*. Univerzita Pardubice, Katedra analytické chemie. Dostupné z: <<http://user.upce.cz/~holcapek>>.
- [43] Volka, K. a kolektiv: *Základy analytické chemie II*. 1. vyd. Brno: VUTUM, 2000, 347 s. ISBN 80-214-1742-0.
- [44] Sommer, L.: *Teoretické základy analytické chemie III*. Brno: VUTUM, 1995, 102 s. ISBN 80-214-0660-7.
- [45] Materiály firmy Sigma Aldrich [online]. Poslední revize 20. 5. 2006. [citováno 25. dubna 2008]. Dostupné z: <<http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/13080/01.pdf>>.
- [46] USKVBL, Standard Operation Procedure Ch-12/SOP 27B: *Stanovení boldenonu, Methylboldenonu a testosteronu ve vzorcích moči metodou GC-MS (CZ)*: USKVBL, 2006.
- [47] Srbová, M.: *Steroidní hormony* [online]. Poslední revize 19.04.2005 [citováno 24. března 2008]. Dostupné z: <[www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/steroid\\_horm.ppt](http://www.lf2.cuni.cz/Ustavy/biochemie/vyuka/steroid_horm.ppt)>.
- [48] Vaníčková, Z.: *Hormony kůry nadledvin, pohlavní hormony* [online]. Poslední revize 24.03.2008 [citováno 24. března 2008]. Dostupné z: <<http://www.mzti.kvalitne.cz/labtech/2005/HORM0405.pdf>>.
- [49] Koruna, I. a kol: *Metrologická terminologie v analytické laboratoři* [online]. Poslední revize 10.06.2003 [citováno 25. dubna 2008]. Dostupné z: <<http://www.eqa.cz/terminologie/Text/Terminologie.htm>>.
- [50] Pyšný, L.: *Stop anabolickým steroidům* [online]. Poslední revize 18.12. 1999 [citováno 25. dubna 2008]. Dostupné z: <<http://www.ftvs.cuni.cz/doping/>>.
- [51] *Anabolic steroids* from Wikipedia [online]. Poslední revize 18.12. 1999 [citováno 25. dubna 2008]. Dostupné z: <[http://en.wikipedia.org/wiki/Anabolic\\_steroid](http://en.wikipedia.org/wiki/Anabolic_steroid)>.
- [52] *Anabolické steroidy* [online] [citováno 25.4.2008] Dostupné z <<http://steroidy.blog.cz/0801/uvod>>.
- [53] *Steroids* [online] [citováno 25.4.2008] Dostupné z: <<http://www.steroidtips.com/index.htm>>

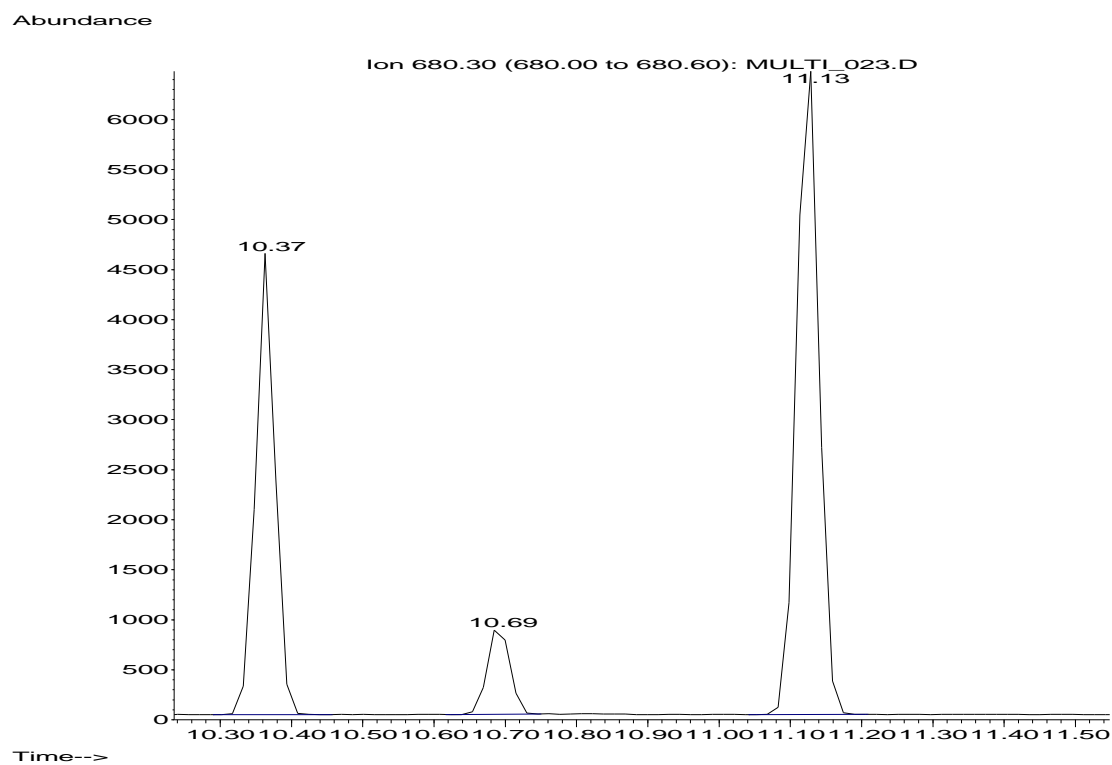
## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CC $\alpha$ .....	Decision limit; Limit rozhodnutí
CC $\beta$ .....	Detection capability; Detekční schopnost
CRL.....	Community reference laboratories; Unijní referenční laboratoře
ECD.....	Electron Capture detector; Detektor elektronového záchytu
EMA.....	European Medicines Agency
FID.....	Flame Ionization Detector; Plamenový ionizační detektor
GC.....	Gas chromatography; Plynová chromatografie
GC-MS.....	Gas chromatography-Mass spectrometry; Plynová chromatografie - Hmotnostní spektrometrie
MRL.....	Maximum residue limits; Maximální limity reziduí
MRPL.....	Minimum required performance limit; Minimální požadované limity analytické metody
MS.....	Mass spectrometry; Hmotnostní spektrometrie
NRL.....	National reference laboratories; Národní referenční laboratoře
PLOT.....	Porous Layer Open Tubular; Kapilární kolona s adsorbentem zachyceným na vnitřních stěnách kapiláry
RSD.....	Relatively standard deviation; Relativní směrodatná odchylka
SCOT.....	Support Coated Open Tubular; Kapilární kolona s kapalinou zakotvenou na nosiči, zachyceném na vnitřních stěnách kapiláry
SPE.....	Solid phase extraction; Extrakce na pevnou fázi
TCD.....	Thermal Conductivity Detector; Tepelně vodivostní detektor
TID.....	Thermoionic Detector; Plamenový termoionizační detektor
ÚSKVBL.....	Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv v Brně
WCOT.....	Wall Coated Open Tubular; Kapilární kolona s kapalinou zakotvenou na vnitřních stěnách kapiláry

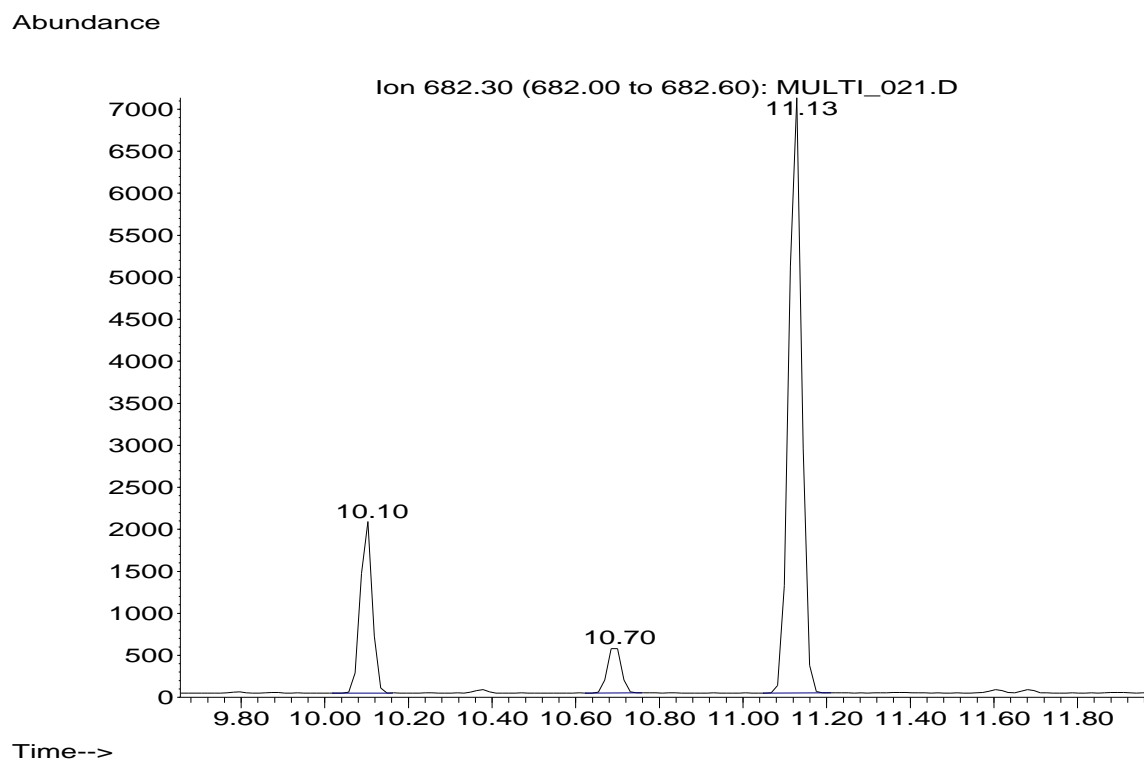
## 8 PŘÍLOHY

Příloha 1	Chromatogram $\alpha+\beta$ testosteronu.
Příloha 2	Chromatogram $\beta$ -testosteronu- $d_2$ .
Příloha 3	Chromatogram $\alpha+\beta$ nortestosteronu.
Příloha 4	Chromatogram $\beta$ -notestosteronu- $d_3$ .
Příloha 5	Chromatogram $\beta$ -boldenonu.
Příloha 6	Chromatogram $\beta$ -boldenonu- $d_3$ .
Příloha 7	Chromatogram methyltestosteronu.
Příloha 8	Chromatogram methyltestosteronu- $d_3$ .
Příloha 9	Chromatogram methylboldenonu.
Příloha 10	Chromatogram methylboldenonu- $d_3$ .
Příloha 11	Chromatogram norclostebolů.
Příloha 12	Chromatogram chlortestosteronu- $d_3$ .



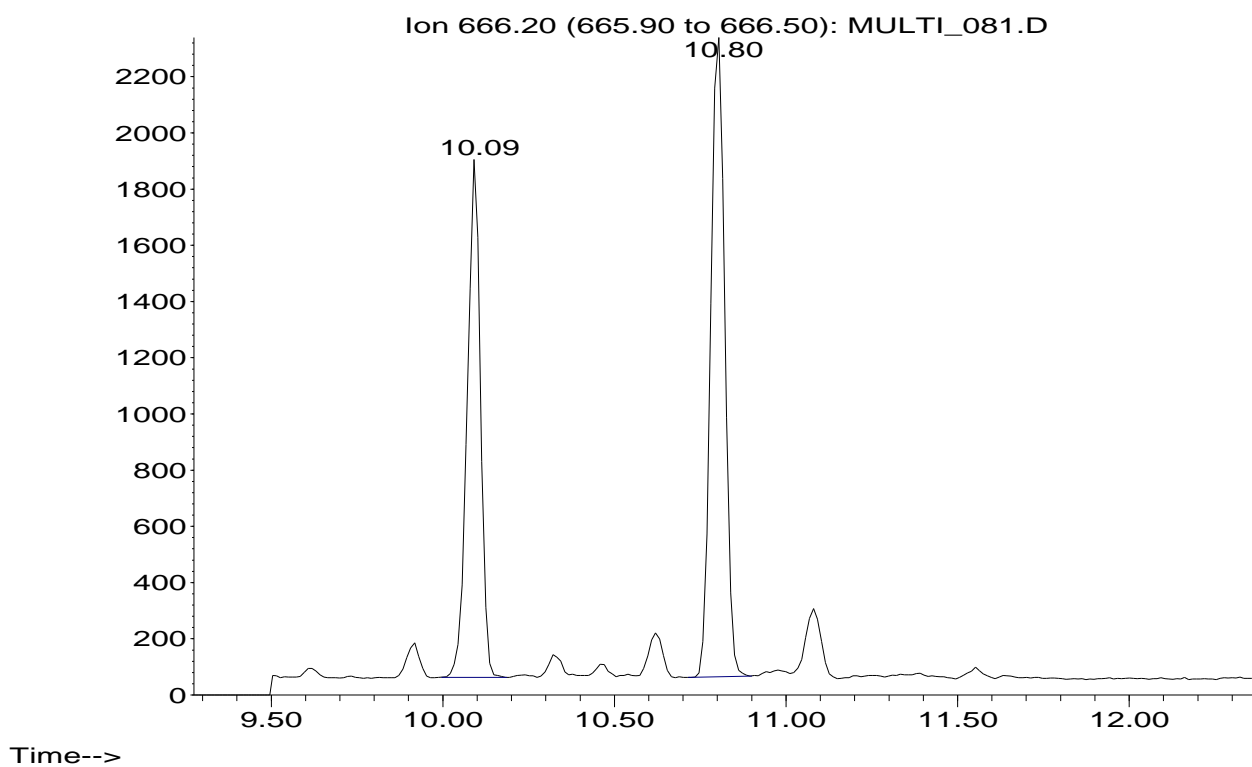


*Příloha 1: Chromatogram  $\alpha+\beta$  testosteronu*



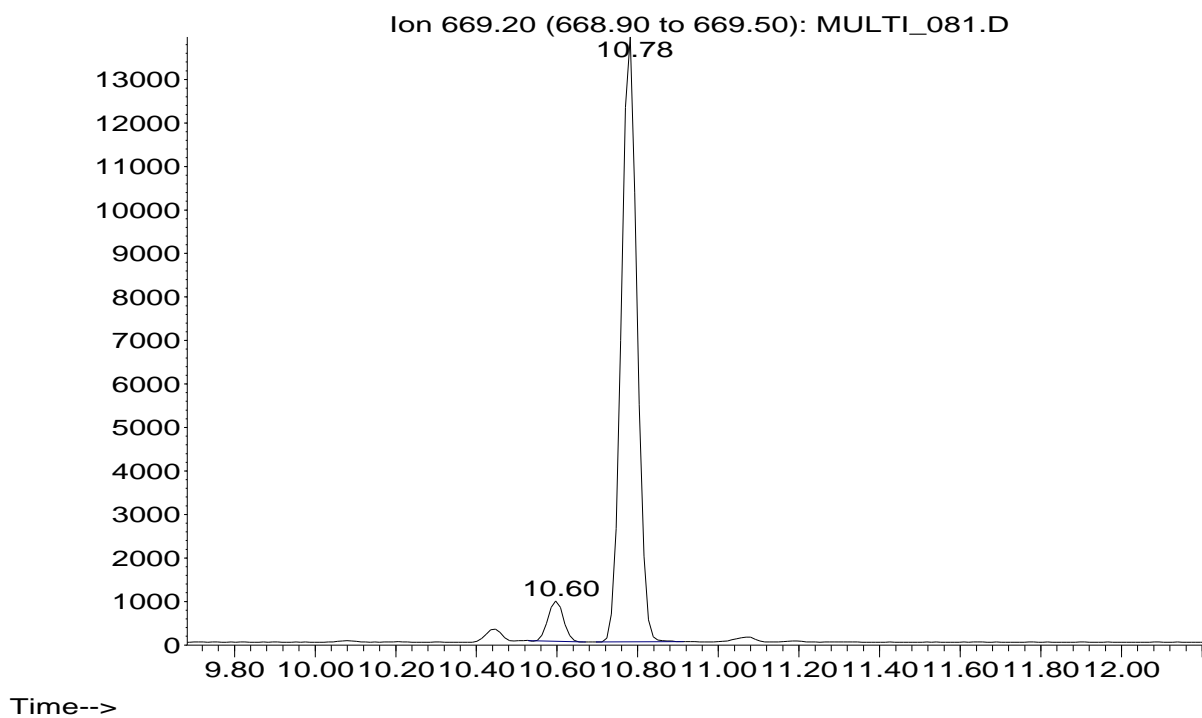
*Příloha 2: Chromatogram  $\beta$ -testosteronu- $d_2$*

Abundance



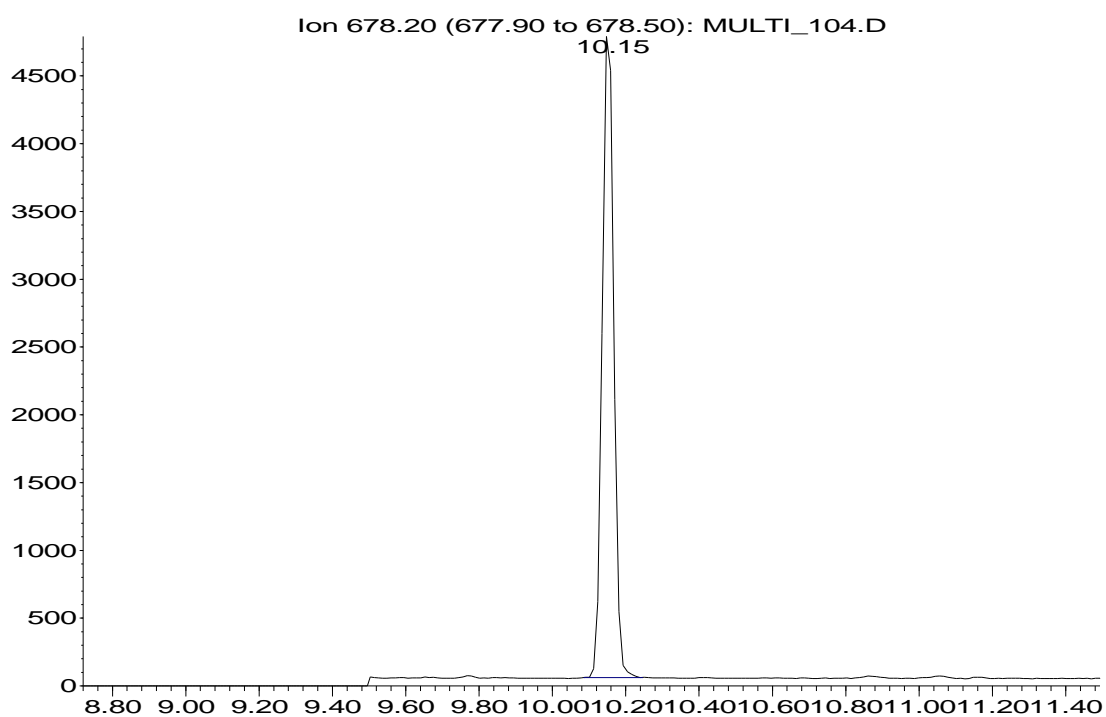
*Příloha 3: Chromatogram  $\alpha+\beta$  nortestosteronu*

Abundance



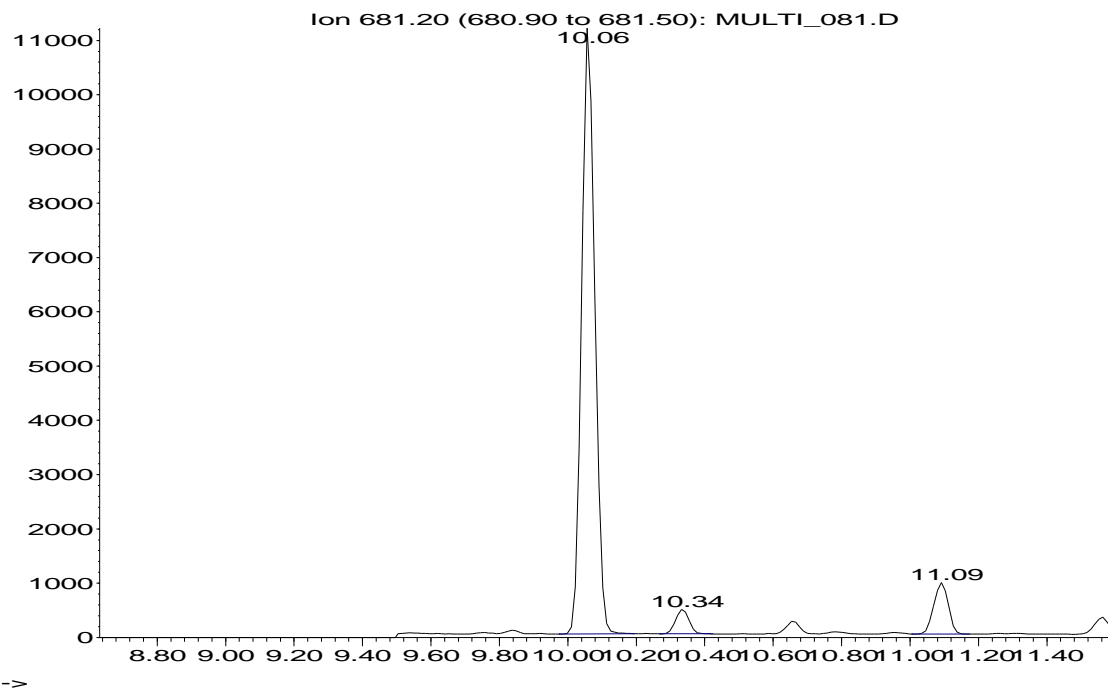
*Příloha 4: Chromatogram  $\beta$ -notestosteronu- $d_3$*

Abundance



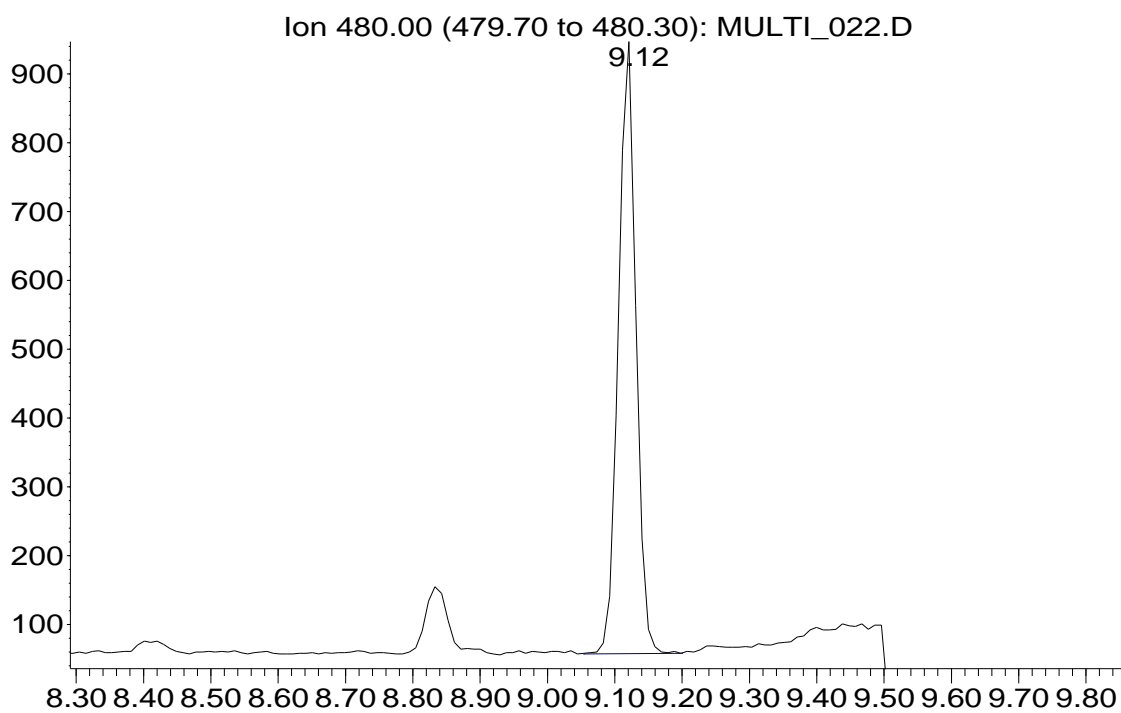
*Příloha 5: Chromatogram  $\beta$ -boldenonu*

Abundance



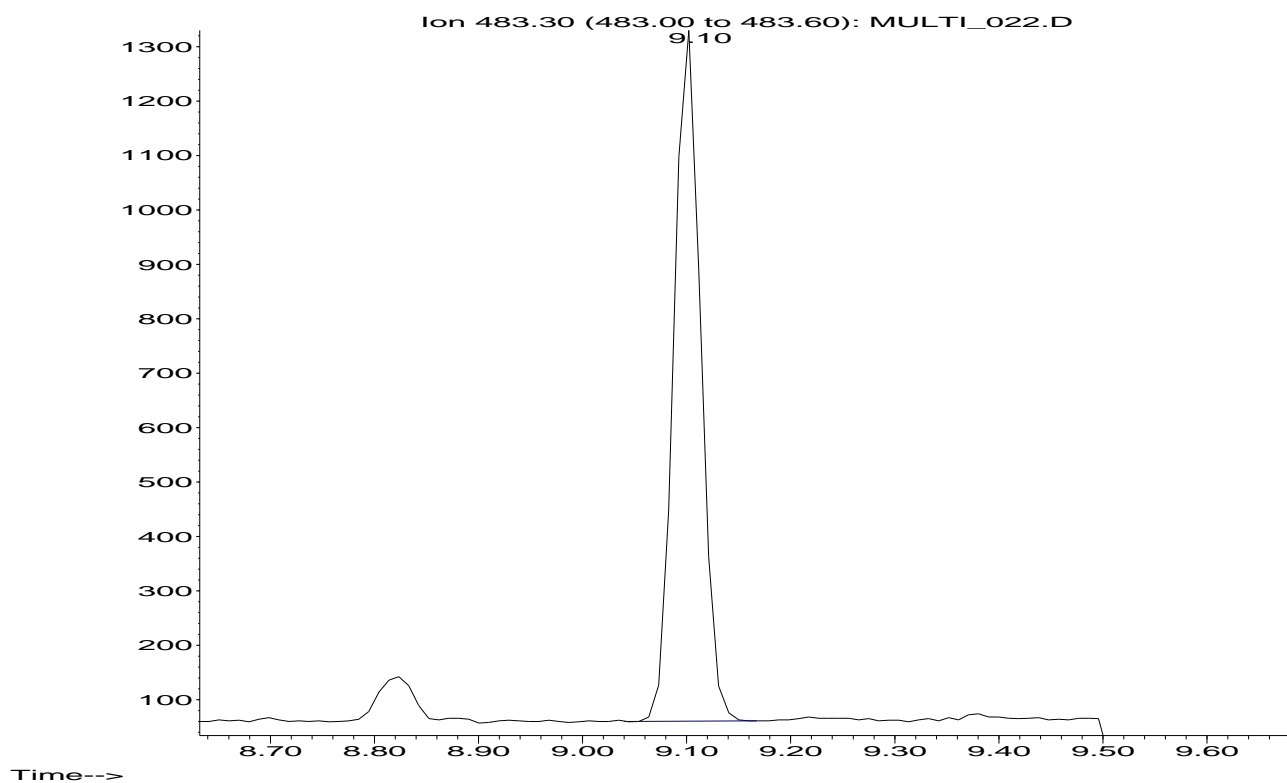
*Příloha 6: Chromatogram  $\beta$ -boldenonu- $d_3$*

Abundance



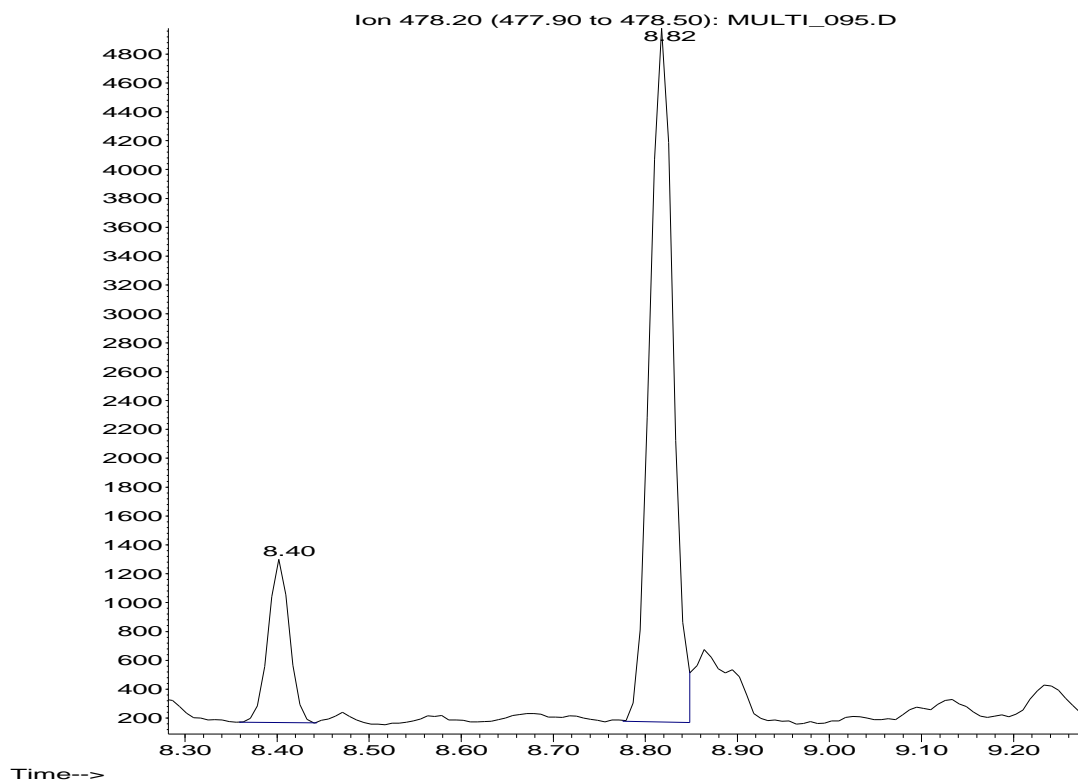
*Příloha 7: Chromatogram methyltestosteronu*

Abundance



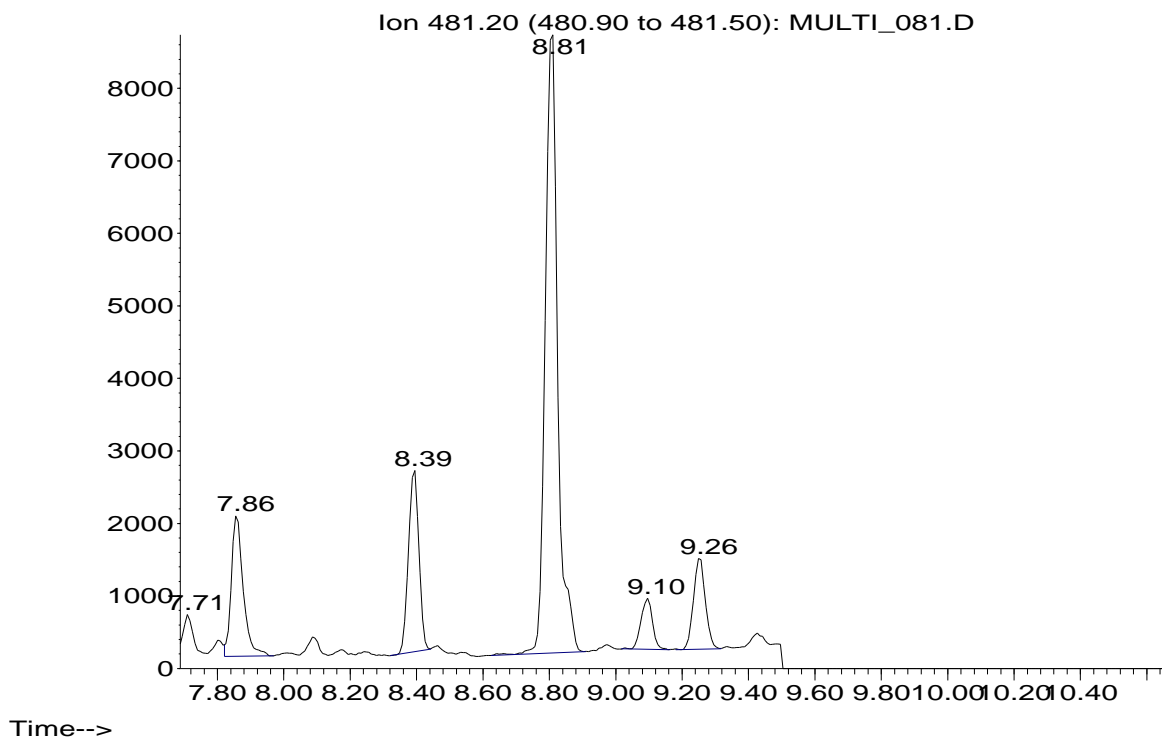
*Příloha 8: Chromatogram methyltestosteronu-d<sub>3</sub>*

Abundance

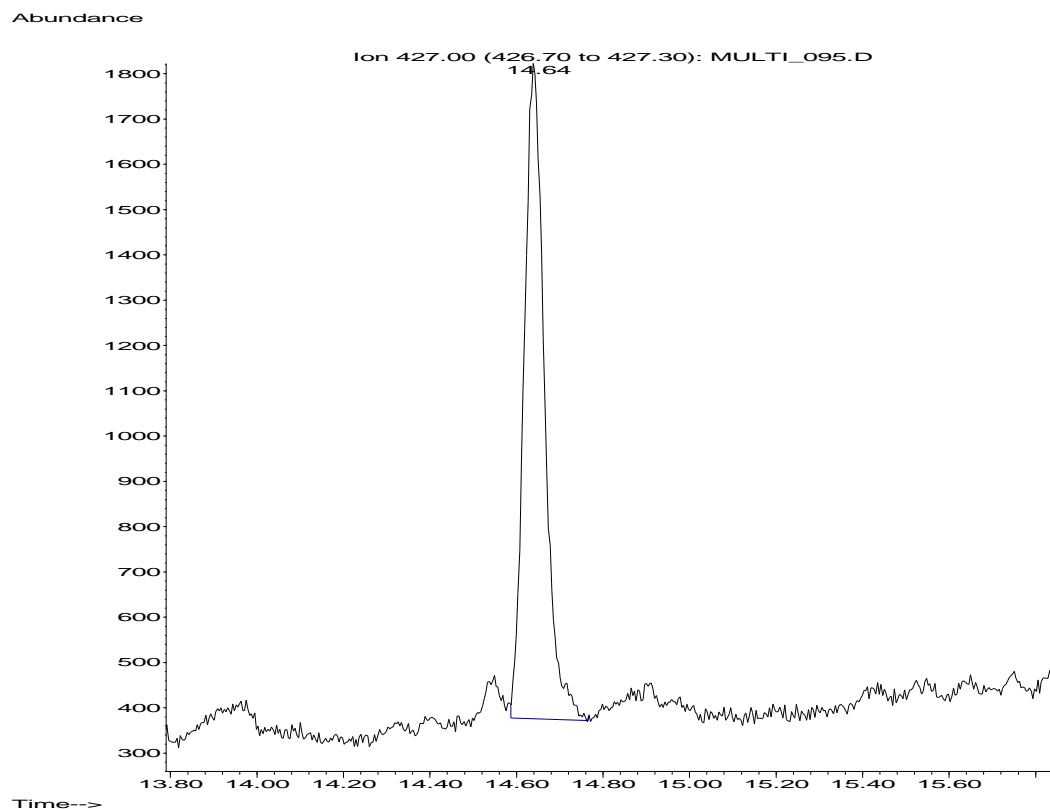


*Příloha 9: Chromatogram methylboldenonu*

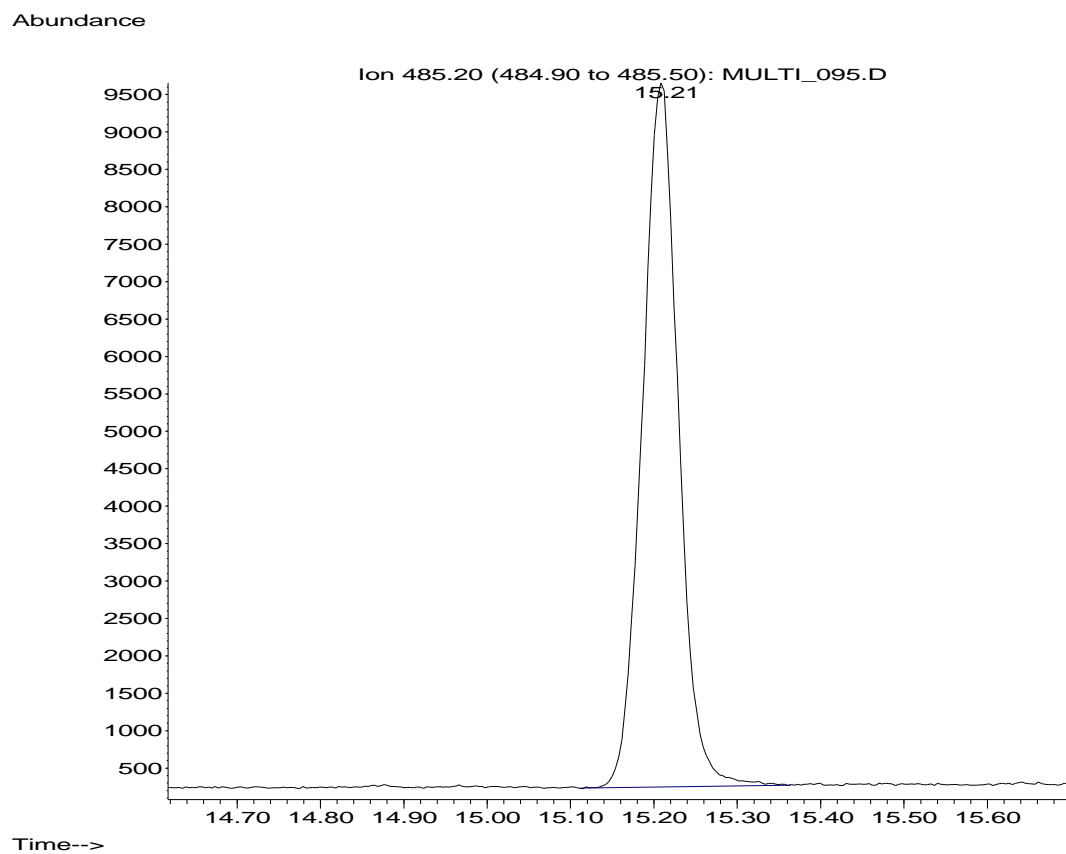
Abundance



*Příloha 10: Chromatogram methylboldenonu-d<sub>3</sub>*



*Příloha 11: Chromatogram norclostebolu*



*Příloha 12: Chromatogram chlortestosteronu-d<sub>3</sub>*